

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Capacidad de formación de biopelículas de cepas de  
*Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos  
procedentes de mercados del Cercado de Lima**

**TESIS**

**Para optar al título profesional de Químico Farmacéutico**

**AUTOR**

**Diego Armando Villanueva Durand**

**ASESOR**

**María Elena Salazar Salvatierra**

**Lima – Perú**

**2015**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por guiar mi camino y brindarme fuerzas y motivación para el desarrollo de la tesis.

A mis padres, por su comprensión y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida y por su especial dedicación en mi desarrollo académico y personal.

A mi hermana Helenn, por brindarme sabios consejos y palabras de aliento en los momentos más complicados.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. María Elena Salazar, asesora de la presente tesis, por brindarme su apoyo, motivación y consejos para la realización de la misma.

A los distinguidos Miembros del Jurado Examinador y Calificador: Dr. Víctor Crispín, Dra. Mirtha Roque, Mg. Julio Ruíz y QF. Teresa Gallardo; por las sugerencias y recomendaciones en la revisión de la tesis.

A los docentes Gerardo Gamarra, José Irey, Robert Almonacid y Nelson Bautista del Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiológica y Biotecnológica “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo y facilidades brindadas durante la ejecución de la tesis.

A Hugo Huamán, por su apoyo y facilidades brindadas en el Laboratorio de Microbiología.

A Jorge García y Sofy del Centro de Control Analítico (CCA), por su colaboración en la fase final de la Parte Experimental.

A mis compañeros de trabajo; Dalia, Alicia y Gustavo, por las facilidades en los horarios y motivación.

A mis amigas Melissa, Heydee y Katy, por su gran apoyo y motivación durante la ejecución de la tesis.

## ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

I.	INTRODUCCIÓN .....	11
II.	GENERALIDADES .....	13
2.1	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
2.1.1	Taxonomía .....	13
2.1.2	Características microbiológicas.....	14
2.1.3	Factores de virulencia .....	16
2.1.4	Serotipos .....	16
2.2	Listeriosis .....	18
2.2.1	Definición de Listeriosis .....	18
2.2.2	Manifestaciones clínicas .....	18
2.2.3	Patogenia .....	21
2.2.4	Epidemiología en el mundo .....	23
2.2.5	Epidemiología en el Perú .....	25
2.3	Biopelículas .....	25
2.3.1	Definición de biopelícula .....	26
2.3.2	Estructura .....	27
2.3.3	Etapas de desarrollo .....	28
2.3.4	Propiedades.....	30
2.3.5	Biopelículas en la industria de alimentos .....	32
2.3.6	Métodos de cuantificación de biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i> ..	33

III.	PARTE EXPERIMENTAL .....	35
3.1	Materiales .....	35
3.1.1	Material Biológico .....	35
3.1.2	Medios de Cultivo .....	35
3.1.3	Equipos .....	36
3.1.4	Reactivos .....	36
3.1.5	Otros materiales.....	37
3.2	Procedimiento .....	38
3.2.1	Toma de muestra.....	38
3.2.2	Homogenización de la muestra.....	38
3.2.3	Análisis Microbiológico .....	39
3.2.4	Ensayo de Biopelículas .....	43
3.2.5	Determinación de la capacidad de formación de biopelículas .....	44
IV.	RESULTADOS .....	46
V.	DISCUSIÓN.....	57
VI.	CONCLUSIONES .....	62
VII.	RECOMENDACIONES .....	63
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
IX.	ANEXOS.....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patogenésis de <i>Listeria monocytogenes</i> . .....	22
Figura 2. Componentes de un sistema de biopelícula. ....	27
Figura 3. Representación esquemática de la formación de biopelícula. ....	30
Figura 4. Porcentaje de muestras de quesos frescos positivas al aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	47
Figura 5. Comparación de resultados positivos y negativos a <i>Listeria monocytogenes</i> en quesos frescos según mercado de procedencia .....	48
Figura 6. Formación de biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i> en microplaca de poliestireno con TSB (DO 595 nm) .....	54
Figura 7. Formación de biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i> en microplaca de poliestireno con BHI (DO 595 nm) .....	56
Figura 8. Colonias de <i>Listeria monocytogenes</i> en Agar Oxford.....	73
Figura 9. Fermentación de <i>Listeria monocytogenes</i> en Caldo Púrpura de Bromocresol con carbohidratos al 5%. ....	74
Figura 10. Prueba de Reducción de nitratos de <i>Listeria sp.</i> .....	75
Figura 11. Prueba de CAMP (Christie – Atkins – Munch – Peterson) .....	76
Figura 12. Biopelículas de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> en microplaca de 96 pocillos de poliestireno .....	77

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 . Diferenciación de las especies del género <i>Listeria</i> .....	15
Tabla 2. Serología de las diferentes especies de <i>Listeria</i> .....	17
Tabla 3. Primeros brotes de listeriosis de origen alimentario .....	24
Tabla 4. Identificación bioquímica de cepas de <i>Listeria sp.</i> aisladas de quesos frescos .....	49
Tabla 5. Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> formadoras de biopelículas empleando como medio de enriquecimiento TSB.....	53
Tabla 6. Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> formadoras de biopelículas empleando como medio de enriquecimiento BHI. ....	55
Tabla 7. Comparación de capacidad de formación de biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i> empleando TSB y BHI como sustrato. ....	56

## **ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**BAM:** Manual de Bacteriología Analítica

**BHI:** Infusión cerebro corazón

**CAMP:** Christie-Atkins-Munch-Peterson

**CDC:** Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

**DO:** Densidad óptica

**DOC:** Punto de corte de densidad óptica

**FDA:** Food & Drug Administration

**EPS:** Exopolisacárido

**LLO:** Listeriolisina O

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**TSA:** Agar Tripticasa de Soya

**TSB:** Caldo Tripiticasa de Soya



## RESUMEN

Se analizaron 75 muestras de quesos frescos de diferentes mercados del Cercado de Lima, con la finalidad de aislar e identificar *Listeria monocytogenes*, además de determinar su capacidad para formar biopelículas. El análisis microbiológico se realizó empleando las metodologías recomendadas por el Manual de Bacteriología Analítica de la Food and Drug Administration (BAM - FDA). El procedimiento para determinar la capacidad de formación de biopelículas fue el método de microplaca de 96 pocillos descrito por Djordjevic con las modificaciones recomendadas por Borucki. El estudio microbiológico permitió aislar *Listeria monocytogenes* en 14 muestras de quesos frescos (18,67%), siendo un valor elevado representando un riesgo potencial para la población consumidora. La capacidad de las cepas de *Listeria monocytogenes* para producir biopelículas en microplaca de poliestireno fue clasificada según la densidad óptica obtenida a 595 nm. Se obtuvo que el 64,29 % (9/14) de las cepas de *Listeria monocytogenes* tienen capacidad de formar biopelículas, distinguiéndose entre formadores débiles y moderadas dependiendo del medio de enriquecimiento estudiado, los cuales fueron caldo tripticasa de soya (TSB) e Infusión cerebro corazón (BHI). El medio BHI fue el más efectivo en promover la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* en microplaca de poliestireno.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, quesos frescos, Cercado de Lima, biopelículas, microplaca.

## SUMMARY

A total of 75 samples of fresh cheese from different markets in Cercado de Lima, were analyzed in order to isolate and identify *Listeria monocytogenes* and also determine its ability to produce biofilms. The microbiological analysis was performed using the methodologies recommended by FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM – FDA). The methodology for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation was the 96-well microtiter plate method described by Djordjevic with the modifications recommended by Borucki. The microbiological study allowed identifying *Listeria monocytogenes* in 14 samples of fresh cheese (18,67%), being a high value and which means a potential risk for the consumer population. The assessment of *Listeria monocytogenes* strains to produce biofilm in microtiter polystyrene plate was classified according to optical density at 595 nm. It was found that 64,29% (9/14) of *Listeria monocytogenes* strains have the ability to produce biofilms, distinguishing between weak and moderate biofilm producers depending of the type of enrichment medium used, which were Trypticase Soy Broth (TSB) and Brain Heart Infusion (BHI). BHI medium was the most effective in promoting the *Listeria monocytogenes* biofilm formation in polystyrene microtiter plate.

Key words: *Listeria monocytogenes*, fresh cheese, Cercado de Lima, biofilm, microtiter plate.

## I. INTRODUCCIÓN

La formación de biopelículas es considerada como una estrategia adaptativa de las bacterias, ya que permite incrementar su capacidad de supervivencia. El estudio de las biopelículas tiene gran importancia en el campo alimentario, debido a que éstas son una fuente importante y constante de contaminación para los alimentos y el ambiente de producción.

Las bacterias presentes en biopelículas desarrollan una gran resistencia hacia los agentes desinfectantes y sanitizantes, la desecación, la luz ultravioleta y los agentes antimicrobianos. En la industria alimentaria es frecuente la presencia de biopelículas en equipos y conducciones ya que pueden formarse en cualquier tipo de superficie; incluyendo plástico, metales y sobre los alimentos. La presencia de biopelículas en estas superficies es la causa principal de contaminación del producto final, además de interferir en los procesos y causar daño a los equipos<sup>1,2</sup>.

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo gram-positivo, psicrótrofo, patógeno de origen alimentario con una amplia distribución en la naturaleza<sup>3</sup>. La listeriosis es una enfermedad producida por *Listeria monocytogenes*, y afecta principalmente a neonatos, mujeres embarazadas, ancianos y pacientes inmunosuprimidos<sup>4</sup>.

Condiciones ambientales como bajas concentraciones de oxígeno y temperaturas de refrigeración; son factores que contribuyen al desarrollo y ubicuidad de esta bacteria, permitiéndole la supervivencia por largos períodos de

tiempo en el medio ambiente, en los alimentos y en las plantas industriales alimentarias<sup>5</sup>.

*Listeria monocytogenes* tiene la habilidad de formar biopelículas debido a su capacidad de proliferación en ambientes fríos y húmedos y su gran facilidad de adherencia a superficies vivas e inertes<sup>2</sup>, lo que facilita su colonización en materiales de uso frecuente en la industria alimentaria, permitiendo contaminar el ambiente de producción y alimentos. En la actualidad se están realizando trabajos de investigación para conocer con detalle la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* a fin de minimizar el riesgo que representan en la industria alimentaria y la salud humana<sup>6</sup>.

## **1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos de mercados del Cercado de Lima.

## **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar e identificar *Listeria monocytogenes* de quesos frescos mediante el empleo de medios selectivos y pruebas bioquímicas.
- Determinar la incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de 10 mercados del Cercado de Lima.
- Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos empleando como sustratos caldos TSB y BHI.

## II. GENERALIDADES

### 2.1 *Listeria monocytogenes*

#### 2.1.1 Taxonomía

En 1926, Murray describió por primera vez a *Listeria monocytogenes* cuando se encontraba estudiando conejos de laboratorio infectados, y la denominó como *Bacterium monocytogenes*<sup>7</sup>. En 1927, Pirie aisló la bacteria y la renombró como *Listerella hepatolytica*<sup>8</sup>. En 1940, él mismo propuso cambiar el nombre de “*Listerella*” por “*Listeria*”, luego de que el Comité de Nomenclatura consideró el nombre “*Listerella*” inválido por duplicidad. Posteriormente en 1948, el género “*Listeria*” fue reconocido en la Sexta Edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey<sup>9</sup>.

Según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, el género *Listeria* pertenece a la familia *Listeriaceae* junto con el género *Brochothrix*<sup>10</sup>. El género *Listeria* actualmente contiene seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi*, como se evidencia por algunas características compartidas como propiedades quimiotaxonómicas, homología en secuencias de ADN, homología en la secuenciación del ARNr 16S y análisis del polimorfismo enzimático. Además, basándose en la hibridación ADN-ADN y transcriptasas del ARNr 16S; se clasificó el género *Listeria* en tres subgrupos: el primero conformado por *L. grayi*, el segundo por *L. monocytogenes* y *L. innocua*, y el tercer subgrupo conformado por *L. ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. seeligeri*<sup>11</sup>.

### 2.1.2 Características microbiológicas

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo gram-positivo, anaerobio facultativo, catalasa positivo, oxidasa negativo, no formador de esporas; cuya morfología varía de cocoide a bacilar corto con bordes redondeados, con flagelos peritricos, los cuales le otorgan la típica característica de movilidad “tumbling”<sup>7, 8, 11, 12</sup>.

Mide entre 0,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  de longitud por 0,4 a 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro<sup>7</sup>, puede crecer en un amplio rango de temperatura que oscila entre -0.5°C y 40°C; sin embargo, su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C. También se puede desarrollar en un amplio rango de pH (5,0 – 9,0), y se considera como halotolerante ya que es capaz de crecer en 10% de cloruro de sodio (NaCl) y sobrevivir por un año a 16% de NaCl cuando el pH es de 6,0<sup>12</sup>.

La expresión de movilidad se puede evidenciar en cultivos semisólidos a la temperatura óptima de 20°C, manifestándose con una típica formación de sombrilla. Las altas temperaturas suprimen esta expresión de movilidad; sin embargo, algunos cultivos incubados a temperaturas entre 30°C y 37°C podrían expresar algún tipo de movilidad semejante<sup>12</sup>.

La actividad hemolítica de *Listeria monocytogenes* se puede evidenciar mediante la elaboración de una  $\beta$ -hemolisina de 58 kDa denominada listeriolisina O, la cual actúa sinérgicamente con la hemolisina producida por *Staphylococcus aureus* para promover una mayor hemólisis en agar sangre. Esta reacción constituye el fundamento de la prueba de CAMP (Christie, Atkins y Munch

Petersen), la cual es una prueba diagnóstica útil para diferenciar las especies *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii*<sup>7,8,12</sup>.

El género *Listeria* presenta reacción positiva con rojo de metilo, Voges-Proskauer y fosfatasa alcalina; y presenta reacción negativa con la ureasa. Además, todas las especies de *Listeria* producen ácido a partir de la esculina, glucosa, manosa y otros carbohidratos, dependiendo de la especie, sin producción de gas. La habilidad de las especies de *Listeria sp.* para producir ácidos a partir de una amplia variedad de carbohidratos es muy útil para fines diagnósticos<sup>13</sup>. (Ver Tabla 1)

**Tabla 1. Diferenciación de las especies del género *Listeria***

Especie	$\beta$ -hemólisis	Producción de ácido a partir de:			Virulencia
		Manitol	Ramnosa	Xilosa	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+a	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	V	-	-
<i>L. welshimeri</i>	+	-	V	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	-
<i>L. grayi</i>	-	+	V	-	-
a: Algunas cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> , las cuales están asociadas principalmente con listeriosis animal, son ramnosa negativas.					
V: Variable. Más del 10% de cepas con esta característica.					

Adaptado del Manual de Bacteriología Analítica. 9na edición<sup>14</sup>.

### 2.1.3 Factores de virulencia

Investigaciones recientes han identificado un gran número de factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* involucrados en puntos clave de su ciclo intracelular<sup>15</sup>.

La Listeriolisina O se considera el factor de virulencia más importante de *Listeria monocytogenes*, y su secreción es esencial para promover el crecimiento intracelular<sup>8</sup>. La Listeriolisina O es activa a bajo pH, codificada por el gen *hly* y activada por tiol<sup>15</sup>.

Además de la Listeriolisina O, *Listeria monocytogenes* secreta al medio otros factores de virulencia como fosfolipasas, internalinas, factor regulador positivo A (*prfA*), precursores Zinc metaloproteasa, y proteínas inductoras del ensamblaje actina y transportadoras de hexosa fosfato<sup>16</sup>.

### 2.1.4 Serotipos

El estudio de los serotipos de *Listeria monocytogenes* responsables de grandes brotes epidémicos de listeriosis ha sido el punto de partida de la variabilidad de la virulencia, ya que se ha demostrado a través de distintas técnicas que existe un número reducido de serotipos implicados en dichos brotes epidémicos con alto potencial de virulencia.

El análisis filogenético basado en los antígenos somático (O) y flagelar (H), permite agrupar las cepas de *Listeria monocytogenes* en 3 grandes grupos genéticos denominados linajes I, II y III. Los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e se



encuentran en el linaje I, y son aislamientos de epidemias de origen alimentario en humanos y de casos esporádicos de listeriosis en animales y humanos. El linaje II engloba a los serotipos 1/2a, 3a, 1/2c y 3c, aislamientos obtenidos de casos esporádicos de listeriosis en humanos. El linaje III incluye a los serotipos 4a, 4c, y algunas cepas 4b; dichos serotipos presentan características atípicas y se aíslan principalmente de animales<sup>3, 15</sup>.

Los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b han sido aislados en más del 90% de los casos de listeriosis humana y animal. Así mismo, el serotipo 1/2c ha sido encontrado como contaminante de alimentos. Algunos serotipos de *Listeria monocytogenes* son compartidos con *Listeria innocua* y *Listeria seeligeri*<sup>3</sup>. (Ver Tabla 2)

**Tabla 2. Serología de las diferentes especies de *Listeria***

Especie		Serotipo
<i>L. monocytogenes</i>	Linaje I	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e
	Linaje II	1/2a, 3a, 1/2c, 3c
	Linaje III	4a, 4c
<i>L. ivanovii</i>		5
<i>L. innocua</i>		4ab, 6a, 6b, ln
<i>L. weishimeri</i>		6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>		1/2b, 4c, 4d, 6b, ln

Adaptado de Torres et. al<sup>3</sup>

## **2.2 Listeriosis**

### **2.2.1 Definición de Listeriosis**

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) definen la listeriosis como una infección grave causada por consumir alimentos contaminados con la bacteria *Listeria monocytogenes*, la cual recientemente ha sido reconocida como un serio problema de salud pública en los Estados Unidos. La enfermedad afecta principalmente a personas de edad avanzada, mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos que tienen el sistema inmunitario debilitado. Sin embargo, también puede afectar a las personas que no presentan estos factores de riesgo<sup>17</sup>.

La dosis infecciosa mínima necesaria de *L. monocytogenes* para que produzca listeriosis es variable respecto a la cepa y susceptibilidad del paciente<sup>18</sup>. Investigaciones recientes indican que la dosis es de, al menos,  $10^2$  UFC/g en el caso de grupos de riesgo, y esta cantidad puede aumentar a  $10^7$  UFC/g en el caso de la población sana<sup>8,15</sup>. Además, se ha señalado al queso como alimento potencial de ocasionar listeriosis humana, considerándose que *L. monocytogenes* es un contaminante habitual en quesos frescos en cifras tan elevadas como  $10^5$  UFC/g<sup>19</sup>.

### **2.2.2 Manifestaciones clínicas**

Las infecciones invasivas de *Listeria monocytogenes* pueden causar meningitis y septicemia en los pacientes infectados. Además, se puede manifestar como una enfermedad gastrointestinal en pacientes inmunodeprimidos<sup>20</sup>.

La listeriosis tiene tres presentaciones clínicas importantes: septicemia, infección del sistema nervioso central y listeriosis materno-fetal. En los adultos, la presentación clínica más común es la meningitis, debido al tropismo que presenta *Listeria monocytogenes* al sistema nervioso central<sup>21</sup>. Además puede producir una gran variedad de infecciones focales (localizadas o de órgano) como por ejemplo: conjuntivitis, endoftalmitis, infecciones de piel, linfadenitis, absceso cerebral, absceso hepático, colecistitis, absceso esplénico, peritonitis, miocarditis, fascitis necrosante, osteomielitis, entre otras. Las formas clínicas de la listeriosis dependen de los órganos afectados y del estado inmunológico del paciente<sup>22</sup>.

Las lesiones características de la listeriosis son los granulomas o listeriomias. Macroscópicamente se presentan en forma miliar de color blanco-grisáceo o amarillento, localizado en pulmón, hígado, bazo adrenal, médula ósea, riñón y ganglios. Microscópicamente, su aspecto varía con el tiempo de evolución. En el estadio inicial aparecen células parenquimatosas degeneradas, y más tarde predominan las reacciones exudativas, las células reticuloendoteliales, las células mononucleares y los neutrófilos en los que se observa *Listeria monocytogenes*<sup>23</sup>.

Las manifestaciones clínicas de septicemia por esta bacteria incluyen fiebre y mialgias, y en ocasiones diarreas y náuseas.

*Listeria monocytogenes* tiene tropismo por el tronco cerebral y las meninges. Las características clínicas diferenciadas por listeriosis son: rigidez de nuca, convulsiones frecuentes, predominio de monocitos en el líquido cefalorraquídeo. La romboencefalitis es una manifestación poco frecuente de

listeriosis y se caracteriza por presentar dos fases. En la primera fase predomina la fiebre, cefalea, náuseas y vómitos; en la segunda, se produce parálisis de uno o varios pares craneales y signos cerebelosos. Los abscesos cerebrales ocurren en el 10% de las listeriosis al SNC<sup>22</sup>.

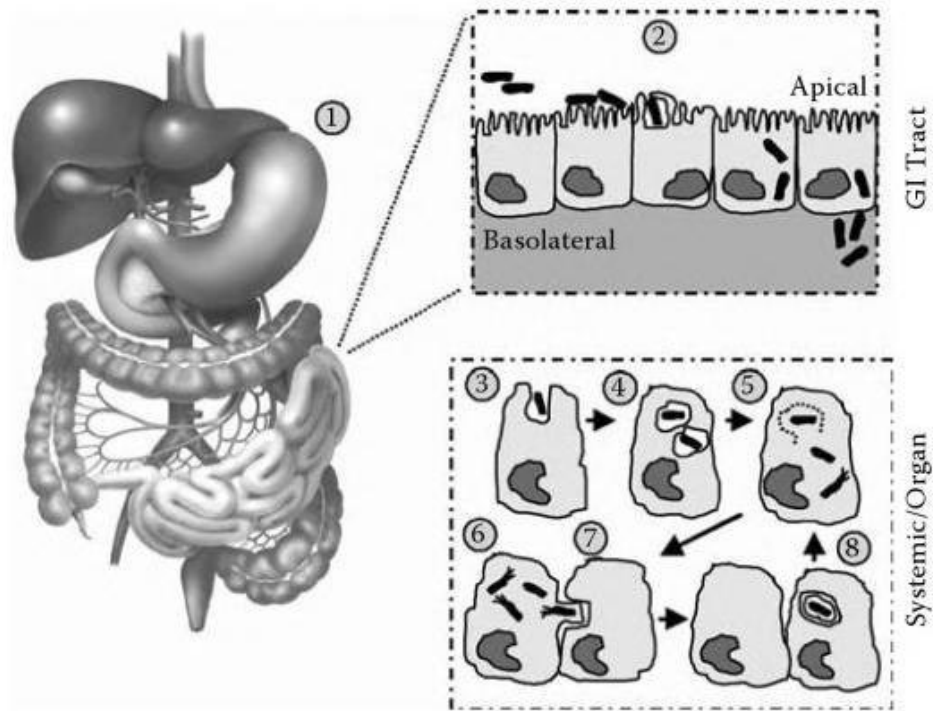
En los brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos contaminados suele aparecer un cuadro gastrointestinal con diarrea, náuseas y vómitos, acompañados de fiebre, aunque se considera atípico<sup>22, 24</sup>.

La listeriosis puede ser adquirida por el feto (listeriosis perinatal) y provocar abortos, nacidos muertos o infección generalizada; y sepsis o meningitis en el neonato (listeriosis neonatal)<sup>22</sup>. La listeriosis adquirida durante el primer trimestre del embarazo es muy frecuente que ocasione un aborto espontáneo. La adquirida durante el segundo trimestre puede conllevar al óbito fetal, parto prematuro y durante el último trimestre, la enfermedad afecta directamente al neonato.

La listeriosis neonatal incluye dos formas de presentación clínica: la primera forma precoz ocurre durante la primera semana de producido el parto, la segunda presentación clínica se considera tardía y ocurre después de la semana de nacimiento. La listeriosis neonatal temprana puede presentar granulomatosis infantiséptica, caracterizada por la formación de abscesos en múltiples órganos; además de sepsis, neumonía, distress respiratorio o ictericia. La forma tardía ocurre frecuentemente entre la segunda y tercera semana después del nacimiento y se presenta en forma de septicemia y meningoencefalitis<sup>25</sup>.

### 2.2.3 Patogenia

Las investigaciones acerca de la patogenia de *Listeria monocytogenes* se encuentran basadas en observaciones en animales de experimentación<sup>3, 16, 26</sup>. Los alimentos son la principal ruta de adquisición del patógeno, por lo que el primer sitio de entrada de la bacteria es el tracto gastrointestinal. Una vez consumido el alimento, *Listeria monocytogenes* debe sobrevivir a un incremento de temperatura y el pH del estómago. Luego, invade la mucosa intestinal a través de las placas de Peyer y células epiteliales intestinales<sup>27</sup>. Una vez que alcanza el torrente sanguíneo y linfa, la mayoría de las bacterias alcanzan el hígado y bazo, donde pueden replicarse en el interior de macrófagos (Ver Figura 1).



**Figura 1.** Patogénesis de *Listeria monocytogenes*.

Leyenda: (1) Ingestión. (2) Pasaje a circulación. (3) Internalización por macrófagos. (4) Ingreso a vacuolas (5) Liberación. (6) Formación de pseudópodos. (7) Fagocitosis. (8) Formación de doble membrana.

Fuente: Adaptado y modificado de Liu D<sup>27</sup>

Una característica importante de *Listeria monocytogenes* es su capacidad para infectar células fagocíticas como enterocitos, hepatocitos y células trofoblásticas. El ciclo intracelular de *Listeria monocytogenes* empieza cuando infecta una célula fagocítica, luego la bacteria induce rápidamente la lisis de su contenido vacuolar mediado por la Listeriolisina O (LLO) y dos fosfolipasas C; para buscar nutrientes en el citoplasma que le permitan multiplicarse. *Listeria monocytogenes* puede movilizarse por el citoplasma e infectar otras células a través de la polimerización de filamentos de actina en un polo de la bacteria,

dirigido por la proteína ActA. La formación de una estructura semejante a una cola de cometa facilita el movimiento intracelular, permitiendo la invasión a células vecinas, mediante un proceso que implica la formación de una protrusión que contiene a la bacteria rodeada por una vacuola de doble membrana<sup>16, 28, 29</sup>.

#### **2.2.4 Epidemiología en el mundo**

El primer caso de listeriosis humana fue reportado en 1929, y desde entonces han ocurrido casos esporádicos en el mundo<sup>30</sup>.

La aparición de los primeros brotes de origen alimentario de listeriosis humana forzó a los diferentes países a sentar las bases para la vigilancia, control y seguimiento microbiológico de *L. monocytogenes* (ver Tabla 3). Los estudios de vigilancia epidemiológica realizados por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) durante los años 1982 y 1986 indicaron una tasa anual de infección de 7.4 casos por 1 millón de población, contando con aproximadamente 1850 casos por año en los Estados Unidos, con 425 muertes<sup>31</sup>. En 1988, en Suiza, se fundó el Centro Nacional de Referencia de Listeriosis (CNRL), para la caracterización de los cultivos de listeriosis en muestras humanas y posteriormente; de animales, alimentos y ambientales<sup>22</sup>. En el año 1993, la tasa anual de incidencia en Estados Unidos disminuyó a 4.4 casos por millón, debido a una mayor regulación a la industria alimentaria. A partir de 1993, en Francia, se extendieron las medidas de control en todos los alimentos potencialmente contaminados con *L. monocytogenes*; las mismas que consistían en el seguimiento microbiológico, la investigación, el saneamiento y la limpieza de las

industrias<sup>22, 32, 33</sup>. En China, los reportes de listeriosis se consideran esporádicos; sin embargo, en los últimos años se viene implementado sistemas de vigilancia epidemiológica<sup>22, 34</sup>.

**Tabla 3.** Primeros brotes de listeriosis de origen alimentario

Año	País	Alimento	Nº de casos	Nº de muertos	Serotipo	Referencia
1949-1957	Alemania	Leche sin pasteurizar	Alrededor de 100		Dato no recogido	Seeliger, 1961
1979	EEUU	Lechuga, apio, tomate	23	5	4b	Ho et al, 1986
1981	Canadá	Ensalada de col	41	18	4b	Schelech et al, 1983
1983	EEUU	Leche sin pasteurizar	49	14	4b	Fleming et al, 1985
1985	EEUU	Queso blando estilo mexicano	314	105	4b	MMWR, 1985
1983-1987	Suiza	Queso blando	122	33	4b	Büla et al, 1995
1986	Austria	Vegetales, Leche sin pasteurizar	28	5	1/2a	Allenberger and Guggenbicher, 1989
1987-1989	Reino Unido	Paté	378		4b	McLaudin et al, 1991
1989-1990	Dinamarca	Queso	26	6	4b	Jensen et al, 1994
1992	Francia	Lengua de cerdo en gelatina	279		4b	Goulet et al, 1993
1993	Francia	Rillettes de cerdo	38		4b	Goulet et al, 1998

Adaptado de Parrilla F<sup>22</sup>.

Las infecciones por listeriosis han aumentado en años recientes en algunos países industrializados tales como Reino Unido, Alemania y España; pero han disminuido o se han mantenido estables en otros países en relación a la adopción de estrategias de control de la contaminación en los productos alimentarios junto a programas de difusión de medidas preventivas en la población<sup>35, 36</sup>.



### **2.2.5 Epidemiología en el Perú**

En lo que respecta al Perú, en el año 1963 se registró el primer caso de listeriosis en un recién nacido. En el año 1977, en la Maternidad de Lima se aisló *Listeria monocytogenes* de hígados e intestinos de necropsias practicadas a fetos y neonatos muertos por listeriosis<sup>37</sup>. En el año 1979, se publicó una serie de 17 casos de dos hospitales de Lima, donde se señalan 8 casos perinatales e incluyen 7 cepas aisladas a partir de 653 muestras de heces (4 de *L. monocytogenes* y 3 de *L. innocua*)<sup>38</sup>. En el 2010, Villegas realizó un estudio de caracterización de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas en el Hospital San Bartolomé durante los años 2001 a 2005 a partir de 18 casos de listeriosis perinatal<sup>25</sup>.

Los casos de listeriosis en el Perú se consideran esporádicos, y las publicaciones realizadas se han circunscrito a documentar casos clínicos de listeriosis humana.

### **2.3 Biopelículas**

Las bacterias pueden existir en la naturaleza bajo dos formas o estados; ya sea como bacterias planctónicas, de libre flotación y suspendidas, o como bacterias sésiles o formadoras de biopelículas, las cuales crecen en colonias de microorganismos adheridas a superficies sólidas.

Aproximadamente el 99% de todas las bacterias se encuentran en forma de biopelículas, y sólo el 1% vive en estado planctónico. Este peculiar comportamiento tiene profundas consecuencias en el modo de analizar la supervivencia de las bacterias y sus múltiples implicancias no sólo a nivel de

industrias; como la alimentaria, sino también porque conllevan a serias consecuencias para la salud <sup>39</sup>.

### **2.3.1 Definición de biopelícula**

Donlan definió las biopelículas como: “un conjunto de células microbianas irreversiblemente asociadas en una superficie, encerradas en una matriz de polisacáridos; y que exhiben un fenotipo alterado en relación con el grado de multiplicación celular y transcripción génica”<sup>40</sup>.

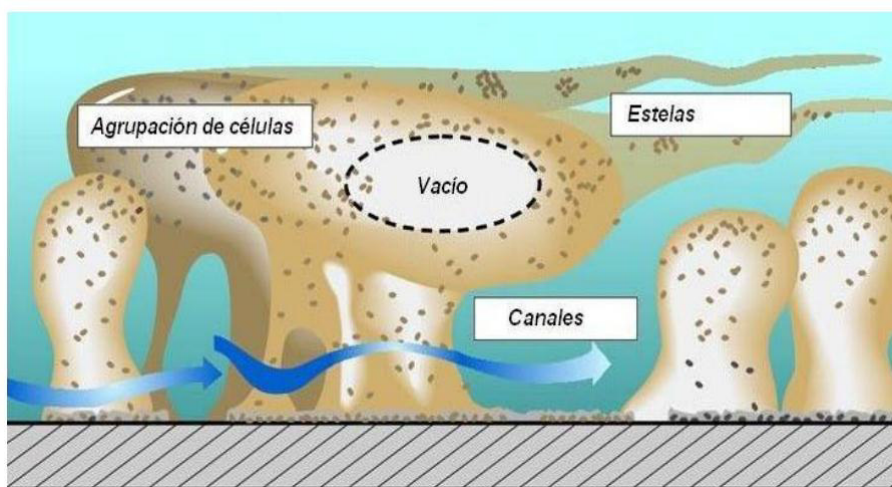
Años más tarde, Donlan y Costerton definieron las biopelículas como: “comunidad derivada de microorganismos sésiles caracterizada por células que están unidas irreversiblemente a un sustrato o interfaz o entre ellas, están incrustadas a una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que han producido, y exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y transcripción génica”<sup>41</sup>.

Las biopelículas cumplen diferentes roles dentro de la naturaleza; entre ellas promueven la diversidad genética y mantienen la densidad celular necesaria para ello; además de proveer protección del stress ambiental como antibióticos y desinfectantes. Además son responsables del desarrollo de varias enfermedades como caries y contaminación de implantes quirúrgicos y dispositivos médicos. Las biopelículas también afectan a las industrias, por ejemplo pueden incrementar la resistencia hidrodinámica<sup>42</sup>.

### 2.3.2 Estructura

La estructura de las biopelículas son heterogéneas, por lo cual se han propuesto diferentes modelos que se basan en la visualización a través de la microscopía; siendo el modelo del champiñón o tulipán el más aceptado.

**Modelo de champiñón o tulipán:** Este modelo estructural emplea la microscopía de barrido confocal para visualizar a las biopelículas como una estructura de champiñón o tulipán con torres, pedestales y canales de agua. La estructura superior consiste en una estructura con forma de tallo delgado, atravesado por canales de agua. Las torres pueden romperse y liberar células que pueden colonizar nuevas superficies. Así mismo, los canales de agua permiten la dispersión e intercambio de moléculas orgánicas, cationes metálicos y metabolitos. Este modelo estructural propone un crecimiento celular rápido de la célula en la periferia de la biopelícula, y un crecimiento lento en el interior<sup>43</sup>.



**Figura 2.** Componentes de un sistema de biopelícula.

Adaptado de Stewart<sup>44</sup>.

### 2.3.3 Etapas de desarrollo

La formación de biopelículas empieza con la adsorción de células que se encuentran en estado planctónico. Algunas células se adhieren a la superficie, producen sustancias extrapoliméricas extracelulares y forman una biopelícula. Otras células se adhieren, luego se despegan y dispersan de la superficie<sup>45</sup>.

Las 5 fases de formación de una biopelícula son:

a. Acondicionamiento de la superficie

La materia orgánica presente en el agua se adsorbe sobre las superficies y forma la película condicionante (“conditioning film”), cambiando las propiedades químicas y físicas de la interfase sustrato/fluido y propiciando la adhesión bacteriana.

b. Adhesión reversible

La adhesión reversible o primaria puede ser:

- Activa: Los flagelos, fimbrias y pilis tipo IV ayudan a las bacterias en la motilidad para alcanzar la superficie al inicio de la adhesión y vencer las fuerzas de repulsión.
- Pasiva: Debido a factores externos como la gravedad, difusión, precipitación de partículas y dinámica de fluidos.

c. Adhesión irreversible

La transición de la adhesión reversible a irreversible se produce por el cambio de una interacción débil por un enlace permanente mediado por polímeros

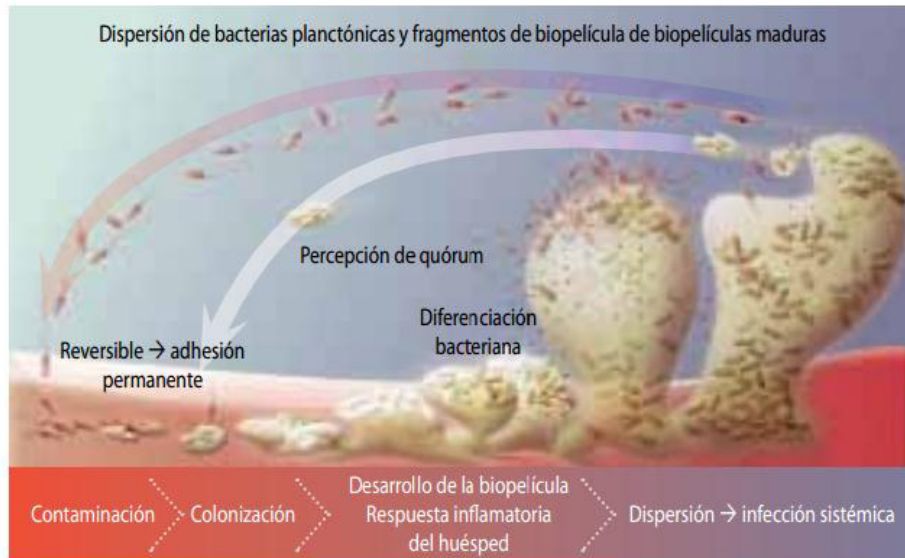
y apéndices extracelulares. Así mismo, los microorganismos cambian los patrones de expresión génica en formas que promueven la supervivencia. Esto suele ser el resultado de un tipo de comunicación bacteriana conocida como detección de quórum o autoinducción.

#### d. Maduración de la biopelícula

Una vez bien adheridas, los microorganismos empiezan a segregar una matriz conocida como sustancia polimérica extracelular o exopolisacárido (EPS). La maduración da como resultado la formación de canales, poros y redistribución de bacterias en el sustrato. El potencial crecimiento de la biopelícula está condicionado a la disponibilidad de nutrientes, el ingreso de éstos dentro de la biopelícula y la eliminación de residuos. Otros factores que pueden controlar la maduración del biofilm son el pH interno, la penetración de oxígeno, fuentes de carbono y la osmolaridad.

#### e. Desprendimiento de microorganismos

Las biopelículas maduras excretan continuamente bacterias planctónicas, microcolonias y fragmentos de biopelícula, que puede dispersarse y adherirse a otras superficies, formando nuevas colonias de biopelícula<sup>39, 46</sup>. (Ver figura 3)



**Figura 3.** Representación esquemática de la formación de biopelícula.

Adaptado de Philips P. et al<sup>46</sup>.

### 2.3.4 Propiedades

Las biopelículas presentan una serie de características que le confieren propiedades relevantes:

- a. Heterogeneidad fisiológica: En una biopelícula se pueden encontrar micronichos muy diferentes respecto al contenido de nutrientes del medio, tensión de oxígeno, tensión de dióxido de carbono, pH, etc. Por lo tanto, podemos encontrar dentro de una misma biopelícula, células con estados fisiológicos muy diferentes y con distintas necesidades fisiológicas.
- b. Fenotipos en la biopelícula: Las bacterias que crecen en biopelículas manifiestan un fenotipo diferente respecto al desarrollado cuando crecen de forma planctónica. Los fenotipos de las bacterias que crecen en

biopelículas son altamente resistentes a agentes externos como antibacterianos y desinfectantes; y mantienen dicha resistencia aun cuando se dependen de la biopelícula<sup>47</sup>.

- c. Quorum sensing: Las bacterias son capaces de prosperar como un sistema de biopelícula debido a la capacidad de comunicación entre ellas. Este sofisticado tipo de comunicación de célula a célula es un mecanismo de supervivencia muy importante que les permite actuar colectivamente, y se denomina “Quorum sensing” y se define como "la regulación de la expresión génica en respuesta a las fluctuaciones en la densidad celular"<sup>48</sup>.
- d. Capacidad adaptativa: Se ve reflejada en el balance entre el crecimiento en condiciones favorables de aporte de nutrientes y medio ambiente y el mantenimiento de la estructura del mismo. En condiciones adversas, la biopelícula puede involucionar a estadíos anteriores, pero en la mayoría de casos se mantiene parte de la misma unida a la superficie, pudiendo volver a desarrollarse cuando las condiciones sean más favorables.
- e. Resistencia frente a antimicrobianos: Las bacterias, cuando crecen en forma sésil, activan genes que proporcionan mayor resistencia frente a los antimicrobianos, en comparación a las formas planctónicas. Además, las bacterias presentes en biopelículas son capaces de sintetizar productos que inactivan antimicrobianos dirigidos contra bacterias de distinta especie residentes en la biopelícula<sup>47</sup>.

### **2.3.5 Biopelículas en la industria de alimentos**

En la industria alimentaria es frecuente la presencia de biopelículas en conducciones, equipos y materiales; ya que pueden formarse en cualquier tipo de superficie, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos. Su presencia puede ser perjudicial e indeseable puesto que en muchos casos contamina el producto final. Esto ocasiona la disminución del período de conservación, así como la transmisión potencial de enfermedades. Uno de los principales problemas en la industria alimentaria se debe a la supervivencia de microorganismos patógenos o alterantes debido a una desinfección insuficiente de las superficies o de los instrumentos en contacto con los alimentos. Además del riesgo de contaminación, la proliferación de biopelículas puede interferir en diferentes procesos y causar daños en los equipos. Por ejemplo; en sistemas de agua potable la formación de biopelículas puede obstruir las cañerías disminuyendo su velocidad y originando incremento en el consumo energético. Las biopelículas presentes en intercambiadores de calor y torres de refrigeración pueden reducir la transferencia de calor y la consiguiente pérdida de eficiencia del proceso. La formación de biopelículas persistentes en las superficies metálicas puede causar corrosión debido a la producción de ácido por parte de las bacterias.

En la industria láctea y otras industrias alimentarias, se emplean los sistemas de ultrafiltración y de ósmosis inversa durante el fraccionamiento de la leche y otros líquidos. Estos filtros y membranas tienen unos poros de muy pequeño diámetro y están continuamente en contacto con el alimento; la más mínima adsorción microbiana puede bloquear los poros y provocar la colmatación



del filtro. Esto además puede producir la reducción del flujo con las consiguientes pérdidas de rendimiento y de producto.

A pesar de que la mayoría de las especies bacterianas tienen la capacidad de formar biopelículas, algunos géneros tienen mayor predisposición a formarlas como es el caso de *Pseudomonas*, *Listeria*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* y *Bacillus*<sup>1,2,6</sup>.

En la industria láctea, el género *Listeria* puede encontrarse presente tanto en la leche como en los productos derivados, y puede estar asociada a la aparición de brotes clínicos. Estudios realizados, demuestran que la presencia de restos de proteínas lácteas en los conductos reduce la adhesión bacteriana, e hipotéticamente inhibe la formación de la biopelícula en sus primeras etapas. Sin embargo, una vez instaurada, la presencia de residuos lácteos en los conductos favorece la supervivencia de la biopelícula ya que supone una fuente de nutrientes para las bacterias<sup>1</sup>. Además, se ha demostrado que cepas persistentes de *Listeria monocytogenes* pueden permanecer por largos períodos de tiempo dentro de las áreas de producción de las industrias alimentarias<sup>49</sup>.

### **2.3.6 Métodos de cuantificación de biopelículas de *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* es un patógeno con capacidad de proliferación en entornos fríos y húmedos, ideales para la formación de biopelículas.

Las cepas de *Listeria* presentan gran facilidad para adherirse a superficies vivas e inertes y requieren solo un corto espacio de tiempo para la unión. Para iniciar la adhesión, utiliza flagelos, pilis y proteínas de membrana. Se ha

observado que ella muestra mayor adhesión cuando está en la fase de mayor actividad metabólica<sup>1</sup>.

Actualmente existen una serie de métodos experimentales directos e indirectos que permiten estudiar la adherencia y colonización de biopelículas de *Listeria monocytogenes*<sup>50,51</sup>:

- a. Métodos indirectos: Éstos los podemos dividir en dos grandes grupos:
  - Métodos indirectos de Remoción-Conteo: Estos primero remueven a *Listeria monocytogenes* de la superficie para luego proceder a su conteo. Ejemplo: Recuento de placa estándar, sonicación.
  - Métodos indirectos de estimación: los que estiman el número de microorganismos adheridos *in situ* midiendo algunas características propias de la bacteria en estudio. Ejemplo: Ensayo inmunoenzimático, ensayos biológicos, películas bacterianas coloreadas, ensayo de microplaca.
- b. Métodos directos: Los cuales permiten observar las colonias bacterianas directamente y corresponden a las técnicas microscópicas. Ejemplo: Microscopía de luz, microscopía focal de escaneo láser, microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido<sup>51</sup>.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Material Biológico

- *Listeria monocytogenes* ATCC 15313
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Rhodococcus equi* ATCC 6939

##### 3.1.2 Medios de Cultivo

- Caldo One Broth-Listeria Base – OXOID
- Suplemento One Broth-Listeria Selective Supplement – OXOID
- Agar base Listeria Selective (Oxford Formulation) – OXOID
- Suplemento Listeria Selective Supplement (Oxford Formulation) – OXOID
- Agar Tripticasa de Soya (TSA) - MERCK
- Agar Columbia Sangre Base – OXOID
- Agar Brain Heart Infusion (BHI) – MERCK
- Caldo Tripticasa de Soya (TSB) – OXOID
- Caldo Brain Heart Infusion (BHI) – OXOID
- Agar SIM - OXOID
- Caldo Nitrato - OXOID
- Extracto de Levadura - OXOID
- Caldo Púrpura de bromocresol - MERCK
- L(+)-Ramnosa monohidratada – MERCK
- D(+)-Xilosa - MERCK
- Manitol – Difco Laboratories

- Glucosa – MERCK
- Maltosa – Difco Laboratories
- Esculina – Sigma Aldrich
- Glicerina – Química Torres
- Sangre de Carnero – ARES Perú

### **3.1.3 Equipos**

- Autoclave – FAVRILL
- Estufa a 37° C – MEMMERT
- Estufa a 30° C – Autonics – TZN4M
- Balanza Analítica – Denver Modelo XP-300
- Vortex – FISHER Mini Shaker
- Cámara de 4° C – COOL SYSTEMS SAC
- Espectrofotómetro UV Visible – Thermo Helios Zeta
- Microscopio óptico – Bausch & Lomb

### **3.1.4 Reactivos**

- Kit para Tinción Gram
- Solución salina fisiológica (0.9%)
- Alcohol medicinal 70°
- Aceite de inmersión
- Solución de Cristal Violeta al 0.1%
- Solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 3%
- Solución de ácido sulfanílico en ácido acético
- Solución de  $\alpha$ -naftol en ácido acético

- Zinc pulverizado

### **3.1.5 Otros materiales**

- Micropipeta Transferpette de 0.5 – 10  $\mu$ L – BRAND
- Micropipeta Transferpette de 100 – 1000  $\mu$ L – BRAND
- Micropipeta de 5-50  $\mu$ L – BOECO Germany
- Placas Petri descartables – ISOLAB GmbH
- Microplaca de Poliestireno estériles – Thermo Scientific
- Bolsas de polietileno
- Pinzas estériles
- Placas Petri estériles de vidrio 15 x 100 mm – PIREX
- Frascos Schott de 250 mL y 500 mL
- Asa Drigalsky estéril
- Asas de siembra de Kohle
- Tubos de ensayo de vidrio (borosilicato) de 10 mL
- Probetas de 100 mL y 250 mL
- Matraces de 250 mL – PIREX
- Pipetas estériles de 1, 5 y 10 mL – PIREX
- Gradillas
- Viales de borosilicato
- Porta y cubre objetos
- Gradillas
- Mechero
- Algodón

## **3.2 Procedimiento**

El método de enriquecimiento empleado fue el recomendado por la ISO 16140/AFNOR. El procedimiento de aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* fue el recomendado por la Food and Drug Administration (FDA) en el Manual de Bacteriología Analítica (BAM)<sup>14</sup> y el procedimiento para determinar la capacidad de formación de biopelículas fue el recomendado por Djordjevic<sup>50</sup> con las modificaciones recomendadas por Borucki<sup>51</sup>.

### **3.2.1 Toma de muestra**

La unidad de muestreo fue de 200 gramos de queso fresco procedentes de 10 mercados del Cercado de Lima. Se adquirieron 8 muestras en cada uno de los siguientes mercados; Idelfonso, Palomino, Central, La Merced, Santa Rosa, El Progreso, Primero de Mayo, La Aurora, Buenos Aires; y en el Mercado Melchoritas solamente se adquirieron 3 muestras. Éstas fueron adquiridas en bolsas de polietileno y conservadas a temperatura de 0 a 4°C hasta su traslado al laboratorio, donde se procedió a refrigerarlos a la misma temperatura.

El procesamiento de las muestras de queso se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM, luego de 24 horas de su adquisición.

### **3.2.2 Homogenización de la muestra**

Las muestras de queso fresco se trituraron y homogenizaron bajo condiciones de esterilidad.

### **3.2.3 Análisis Microbiológico**

#### **3.2.3.1 Enriquecimiento Selectivo Preliminar**

Se colocaron 25 gramos de queso triturado en 225 mL de Caldo de Enriquecimiento “One Broth-Listeria Base”, que contenía el suplemento selectivo “One Broth-Listeria Selective Supplement”. Posteriormente se incubó las muestras durante 24 horas a 30 °C.

#### **3.2.3.2 Segundo Enriquecimiento**

Transcurridas las 24 horas, se tomó 0,1 mL del caldo del primer enriquecimiento y se colocó en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo One Broth-Listeria Base y se llevó a incubación a 30 °C por 24 horas.

#### **3.2.3.3 Aislamiento Selectivo**

Transcurridas las 24 horas de incubación del segundo enriquecimiento, se evaluó la fermentación de esculina evidenciada por ennegrecimiento del medio tanto en el primer y segundo enriquecimiento. Posteriormente se tomó 20 µL del caldo de cada muestra que presentaba ennegrecimiento del medio, y se sembró en agar Oxford. Se incubó a 35 °C de 24 a 48 horas. Luego de transcurrido el tiempo, se seleccionaron de 4 a 5 colonias sospechosas, y se volvió a sembrar en Agar Oxford para obtener una mejor identificación bioquímica.

#### **3.2.3.4 Conservación de cepas**

Se seleccionaron las colonias sospechosas para luego sembrarlas en agar TSA suplementado con 0,6% de extracto de levadura, incubándose a 30 °C por 48 horas y se llevó a refrigeración para el posterior análisis bioquímico.

### 3.2.3.5 Análisis Bioquímico

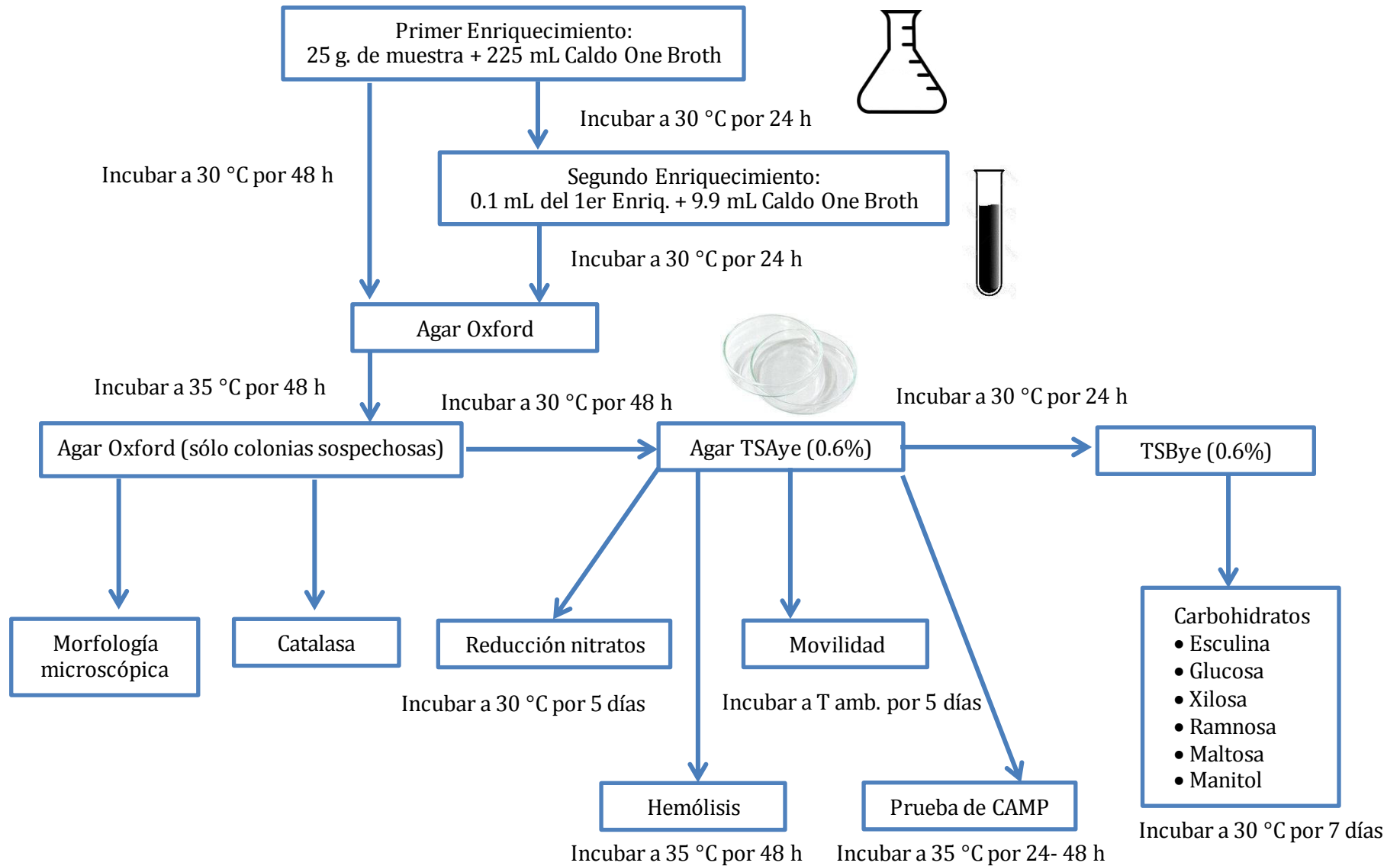
Se examinó a simple vista, apreciando el crecimiento de colonias oscuras con halo negro (hidrólisis de esculina) en la superficie del medio selectivo “Agar base *Listeria* selective (Oxford)”. Se realizó la diferenciación bioquímica empleando como referencia el Manual de Bacteriología Analítica 9na edición<sup>14</sup>.

- Morfología microscópica: Se realizó tinción Gram observando bacilos gram positivos.
- Prueba de la catalasa: Se realizó para comprobar la presencia de la enzima catalasa mediante la adición de peróxido de hidrógeno al 3%.
- Uso de carbohidratos: Se inoculó 25 µL de las cepas conservadas en caldo TSB suplementado con 0,6 % de extracto de levadura, en tubos con Caldo Púrpura de Bromocresol al 5% de los siguientes azúcares: manitol, maltosa, ramnosa, glucosa, xilosa y esculina. Se incubó a 35 °C por un período de 7 días, observando cambio de color diariamente.
- Reducción de nitratos: Se inoculó 25 µL de caldo TSB suplementado con 0,6 % de extracto de levadura, en Caldo Nitrato. Se incubó a 35 °C por 5 días. Se adicionó 0,2 mL del Reactivo A (ácido sulfanílico en ácido acético) y 0,2 mL del Reactivo C (alfa-naftol en ácido acético). Si no se desarrolla color, se adiciona Zinc en polvo y se espera por una hora. Un color naranja indica reducción del nitrato.



- Movilidad: Se sembró por puntura en el medio SIM a partir del caldo TSB suplementado con 0,6 % de extracto de levadura y se incubó a temperatura ambiente por 7 días, para luego observar el patrón de movilidad que se desarrolló dando la forma de paraguas.
- Hemólisis: A partir del agar TSA con 0,6 % de extracto de levadura, se sembró en agar sangre de carnero al 5% y se incubó 48 horas a 35 °C. Para la siembra en dicho agar, se procedió a dividir la base de la placa en 4 cuadrículas del mismo tamaño, se sembró en cada cuadrícula cada cepa sospechosa. Se observó el tipo hemólisis. *Listeria monocytogenes* presenta hemólisis beta.
- Prueba de CAMP: A partir del agar TSA con 0,6 % de extracto de levadura, se sembró en agar sangre de carnero las cepas  $\beta$ -hemolíticas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Rhodococcus equi* ATCC 6939 en paralelo y diametralmente opuestas una de la otra. Se sembró varias cepas sospechosas paralelas unas de las otras, en ángulo recto entre las siembras de *S. aureus* y *R. equi*. Se incubó a 35 °C de 24 a 48 horas. Se examinó la hemólisis. Las cepas de *Listeria monocytogenes* presentaron hemólisis pronunciada cerca de la zona de hemólisis de *S. aureus*.

## ESQUEMA DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes* POR MÉTODO MICROBIOLÓGICO



### 3.2.4 Ensayo de Biopelículas

El procedimiento para determinar la capacidad de formación de biopelículas fue el método de microplaca de 96 pocillos descrito por Djordjevic<sup>51</sup> con las modificaciones recomendadas de Borucki<sup>52</sup>.

- a. Se sembró cada cepa de *Listeria monocytogenes* en 10 mL de Caldo TSB y 10 mL de Caldo BHI a 32 °C de 18 a 24 horas.
- b. Se transfirió alícuotas del cultivo de Caldo TSB a un nuevo Caldo TSB hasta llevar a la Escala McFarland 0.5, se procedió de la misma manera con el Caldo BHI.
- c. Se transfirió 100 µL de Caldo TSB y BHI a cada pocillo de la microplaca de poliestireno. Se realizó por triplicado.
- d. Se transfirió 100 µL de Caldo TSB y BHI a los pocillos de los extremos de la microplaca de poliestiereno, los que serán Controles.
- e. Se transfirió 100 µL del Caldo TSB y BHI conteniendo las cepas de *Listeria monocytogenes* (escala de McFarland 0.5), a cada pocillo de la microplaca de poliestireno. Se realizó por triplicado.
- f. Se incubó la microplaca de poliestireno a 32 °C por 20 horas.
- g. Después del periodo de incubación, se removió el medio de cultivo de los pocillos y se lavó la microplaca con agua estéril cinco veces para remover restos bacterianos asociados.
- h. Las placas se dejaron secar por 45 minutos y los pocillos se tiñeron con 150 µL de solución cristal violeta al 0,1% por 45 minutos.

- i. Luego de la tinción, se lavó nuevamente la placa con agua estéril cinco veces. En este punto, las biopelículas fueron visibles como anillos morados en las paredes y fondo de cada pocillo.
- j. El análisis cuantitativo se realizó añadiendo 200  $\mu$ L de etanol al 96%. Se transfirieron las alícuotas y se llevó a 2 mL de etanol al 96% para leer la densidad óptica a 595 nm.

### **3.2.5 Determinación de la capacidad de formación de biopelículas**

La capacidad de las cepas de *Listeria monocytogenes* de producir biopelícula fue clasificada de acuerdo a la densidad óptica (DO) obtenida a 595 nm.

Se empleó las recomendaciones de Stepanovic<sup>53</sup> para definir el punto de corte (DOC) y la clasificación de las cepas. El DOC se define como el promedio de las densidades ópticas obtenidas en los controles negativos más 3 desviaciones estándar. La capacidad de formación de biopelícula de las cepas se clasificó en base a la DO y DOC; según la siguiente clasificación:

- Cepas no formadoras de biopelícula:  $DO \leq DOC$
- Cepas formadoras débiles de biopelícula:  $DOC < DO \leq 2xDOC$
- Cepas formadoras moderadas de biopelícula:  $2xDOC < DO \leq 4xDOC$
- Cepas formadoras fuerte de biopelícula:  $4xDOC < DO$

**Análisis estadístico:** Los resultados obtenidos fueron analizados empleando el programa Sigma Stat Statistical Software (IBM SPSS Statistics 22.0), mediante pruebas no paramétricas tales como Kruskal-Wallis, con el objetivo de detectar la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## IV. RESULTADOS

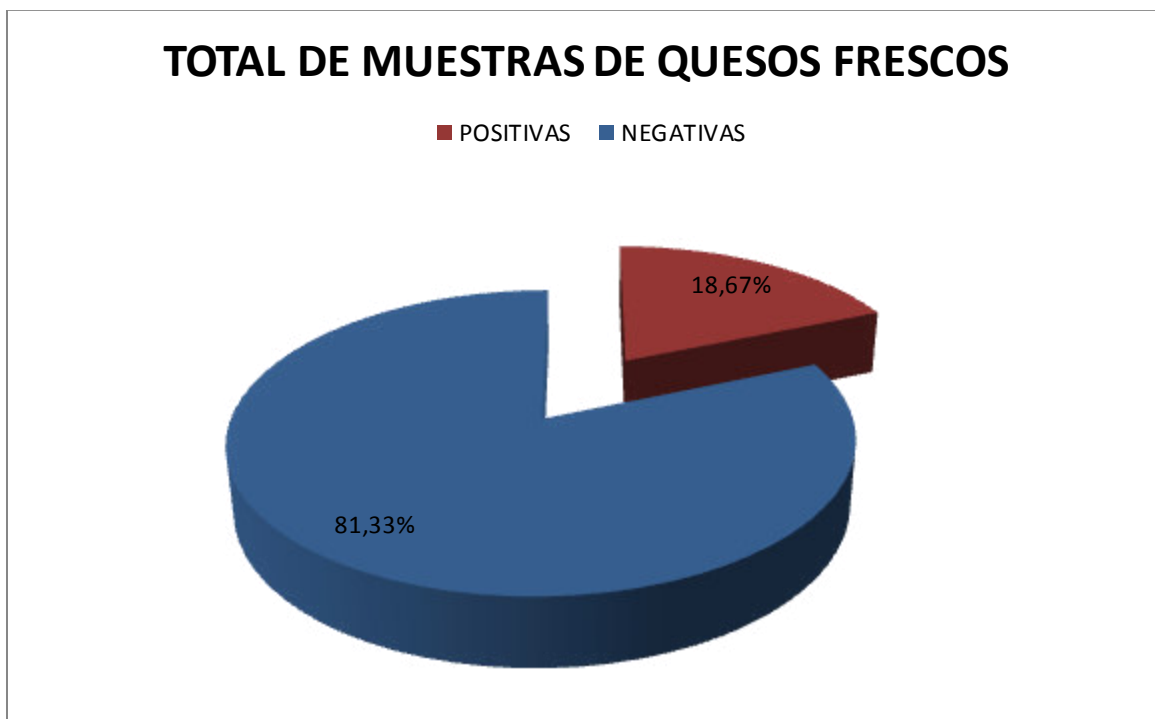
### 4.1 Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos:

De las 75 muestras de queso fresco analizadas procedentes de 10 diferentes mercados del Cercado de Lima, se logró aislar *Listeria monocytogenes* en 14 muestras expendidas en los mercados del Cercado de Lima. (Figura 4)

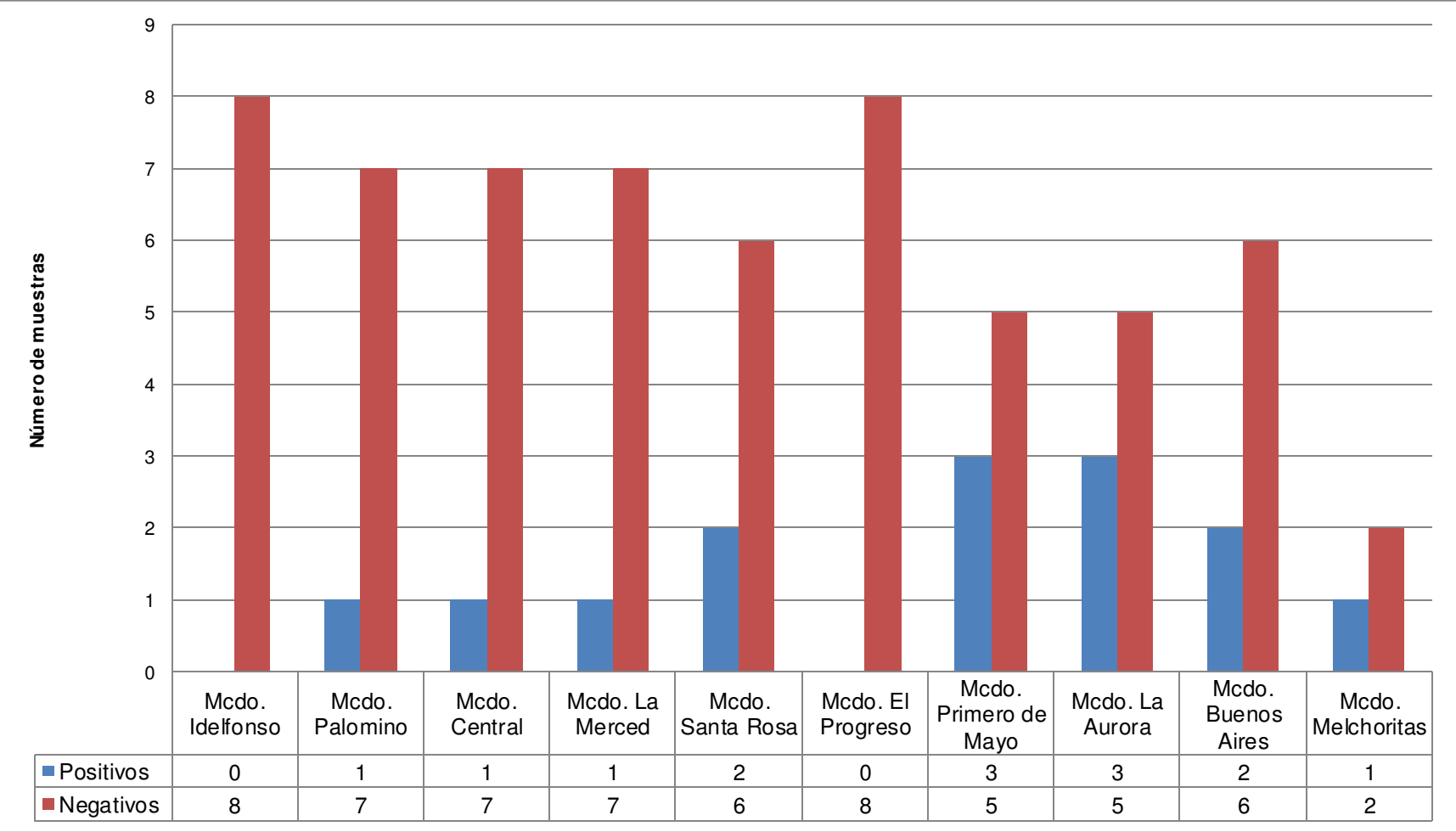
De las 14 muestras positivas de quesos frescos, 3 muestras correspondieron al mercado Primero de mayo (37,5%), 3 muestras al mercado La Aurora (37,5%), 2 muestras del mercado Santa Rosa (25%), 2 muestras del mercado Buenos Aires (25%), 1 muestra del mercado Palomino (12,5%), 1 muestra del mercado Central (12,5%), 1 muestra del mercado La Merced (12,5%); y 1 muestra del mercado Melchoritas (33,3%). Además, no se detectaron muestras positivas en los mercados Idelfonso y El Progreso (Figura 5).

En la Tabla N° 4 se aprecia las características bioquímicas de las cepas de *Listeria sp.* aisladas de las 75 muestras de quesos frescos adquiridas de 10 mercados del Cercado de Lima.

**FIGURA 4. PORCENTAJE DE MUESTRAS DE QUESOS FRESCOS POSITIVAS  
AL AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes***



**FIGURA 5. COMPARACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS A *Listeria monocytogenes* EN QUESOS FRESCOS SEGÚN MERCADO DE PROCEDENCIA**





**TABLA 4. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS DE *Listeria sp.* AISLADAS DE QUESOS FRESCOS**

M	Proc.	1E	2E	Agar Oxford	CG	Cat.	Movilidad	Caldo Nitrato	Hemólisis	Fermentación de Azúcares						CAMP
										G	ES	ML	R	MN	X	
1	Mercado Idelfonso	+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	+	
2		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	-	+	
3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	-	+	
5		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	+	
6		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	-	-	+	
7		+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	
8		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	+	
9	Mercado Palomino	+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	-	+	
10		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	-	+	
11		+	+	+	+	+	+	-	β	+	+	+	-	-	-	+ ( <i>L. ivanovii</i> )
12		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	-	-	+	
13		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	+	-	+	
15		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	-	+	
16		+	+	+	+	+	+	-	α/β	+	+	+	+	-	-	+ ( <i>L. monocyt</i> )
17	Mercado Central	+	-	+	+	+	+	-	β	+	+	+	-	-	-	+ ( <i>L. monocyt</i> )
18		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	+	
19		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	-	
21		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	+	
22		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	-	
23		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	+	
24		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Leyenda:** (M) Muestra, (Proc.) Procedencia, (1E) Primer enriquecimiento, (2E) Segundo enriquecimiento, (CG) Coloración Gram, (Cat) Catalasa, (G) Glucosa, (ES) Esculina, (ML) Maltosa, (R) Ramnosa, (MN) Manitol, (X) Xilosa, (*L. monocyt*) *Listeria monocytogenes*.

M	Proc.	1E	2E	Agar Oxford	CG	Cat.	Movilidad	Caldo Nitrato	Hemólisis	Fermentación de Azúcares						CAMP
										G	ES	ML	R	MN	X	
25	Mercado La Merced	+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	+	
26		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	-	
27		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	+	
29		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	+	
30		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	+	
31		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32		+	-	+	+	+	+	-	β	+	+	+	+	-	-	+ ( <i>L. monocyt</i> )
33	Mercado Santa Rosa	+	+	+	+	+	+	-	β	+	+	+	+	-	-	+ ( <i>L. monocyt</i> )
34		+	-	+	+	+	+	-	β	+	+	+	+	-	-	+ ( <i>L. monocyt</i> )
35		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	-	
36		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	-	
38		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	-	
39		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	-	
40		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
41	Mercado El Progreso	+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	-	
42		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	-	
43		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	-	
44		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	-	
45		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	-	
47		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	+	
48		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	+	

**Leyenda:** (M) Muestra, (Proc.) Procedencia, (1E) Primer enriquecimiento, (2E) Segundo enriquecimiento, (CG) Coloración Gram, (Cat) Catalasa, (G) Glucosa, (ES) Esculina, (ML) Maltosa, (R) Ramnosa, (MN) Manitol, (X) Xilosa, (*L. monocyt*) *Listeria monocytogenes*.

M	Proc.	1E	2E	Agar Oxford	CG	Cat.	Movilidad	Caldo Nitrato	Hemólisis	Fermentación de Azúcares						CAMP
										G	ES	ML	R.	MN	X	
49	Mercado Primero de Mayo	+	+	+	+	+		-		+	+	+	+	+	+	
50		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	+	
51		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52		+	-	+	+	+	+	-	β	+	+	+	-	-	-	+ ( <i>L.monocytogenes</i> )
53		+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
54		+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+ ( <i>L.monocytogenes</i> )
55		+	+	+	+	+	+	-	β	+	+	+	-	-	-	+ ( <i>L.monocytogenes</i> )
56		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	-	+	
57	Mercado La Aurora	+	-	+	+	+	+	-	β	+	+	+	+	-	-	+ ( <i>L.monocytogenes</i> )
58		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	-	+	
59		+	+	+	+	+	+	-	β	+	+	+	+	-	-	+ ( <i>L.monocytogenes</i> )
60		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	-	+	
61		+	+	+	+	+	+	-	α/β	+	+	+	+	-	-	+ ( <i>L.monocytogenes</i> )
62		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	Mercado Buenos Aires	+	-	+	+	+	+	-	α/β	+	+	+	+	-	-	+ ( <i>L.monocytogenes</i> )
66		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	-	
68		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69		+	+	+	+	+	+	-	β	+	+	+	+	-	-	+ ( <i>L.monocytogenes</i> )
70		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	-	+	
71		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	-	
72		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	-	
73	Mercado Melchoritas	+	+	+	+	+	+	-	β	+	+	+	+	-	-	+ ( <i>L.monocytogenes</i> )
74		+	+	+	+	+	+	-		+	+	+	-	+	+	
75		+	-	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	+	

**Leyenda:** (M) Muestra, (Proc.) Procedencia, (1E) Primer enriquecimiento, (2E) Segundo enriquecimiento, (CG) Coloración Gram, (Cat) Catalasa, (G) Glucosa, (ES) Esculina, (ML) Maltosa, (R) Ramnosa, (MN) Manitol, (X) Xilosa, (*L. monocyt*) *Listeria monocytogenes*.

#### **4.2 Capacidad de formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes***

Se obtuvo que 64,29% (9/14) de las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos tienen capacidad de formar biopelículas. Cuando se utilizó como sustrato el TSB (medio poco enriquecido) se encontró que 7,14% (1/14) de las cepas de *Listeria monocytogenes* tienen capacidad moderada, 57,15% (8/14) tienen capacidad débil y 35,71% (5/14) no tienen capacidad de formar biopelículas (Ver Tabla 7). Al emplear un medio enriquecido como el caldo BHI, se encontró que 14,29% (2/14) de las cepas tienen capacidad moderada de formar biopelículas, 50% (7/14) tienen capacidad débil y 35,71% (5/14) no tienen capacidad de formar biopelículas (Ver Tabla 7).

Se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre las absorbancias de los medios de enriquecimiento estudiados (TSB y BHI) ( $p < 0.05$ , Kruskal –Wallis).

**TABLA 5. Cepas de *Listeria monocytogenes* formadoras de biopelículas empleando como medio de enriquecimiento TSB.**

Cepa	Absorbancia Cepa 1	Absorbancia Cepa 2	Absorbancia Cepa 3	Promedio	Desviación Estándar
16	0,267	0,246	0,221	0,245	0,0230
17	0,456	0,496	0,463	0,472	0,0214
32	0,432	0,445	0,467	0,448	0,0177
33	0,651	0,909	1,072	0,877	0,2123
34	0,396	0,420	0,426	0,414	0,0159
52	0,510	0,426	0,558	0,498	0,0668
54	0,378	0,426	0,397	0,400	0,0240
55	0,389	0,356	0,306	0,350	0,0417
57	0,268	0,244	0,236	0,249	0,0165
59	0,222	0,206	0,197	0,208	0,0127
61	0,275	0,215	0,226	0,239	0,0319
65	0,355	0,336	0,296	0,329	0,0301
69	0,248	0,223	0,214	0,228	0,0176
73	0,399	0,354	0,312	0,355	0,0435
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	0,245	0,197	0,184	0,209	0,0321
Control	0,163	0,196	0,202	0,187	0,0210

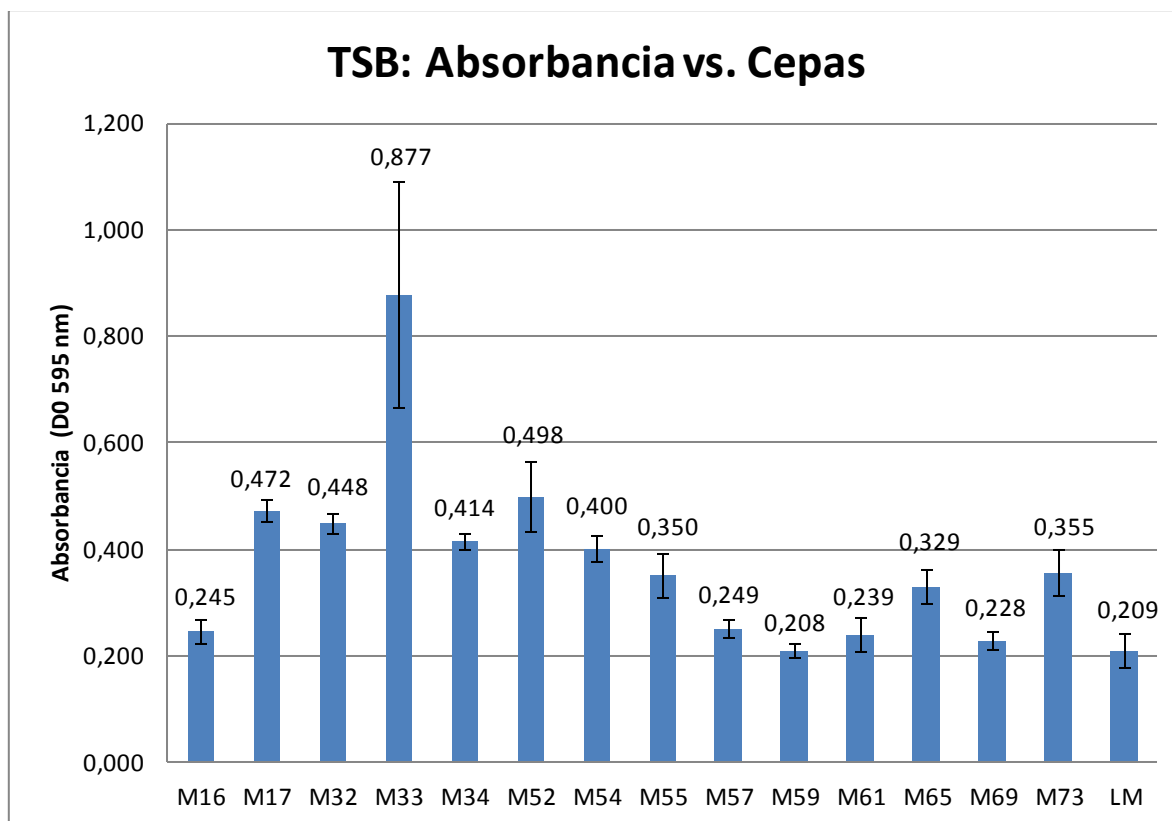
Leyenda:

	No formadora de biopelículas
	Formadora débil de biopelículas
	Formadora moderada de biopelículas

Clasificación de capacidad de formación de biopelícula según Stepanovic:

1. Cálculo del  $DOC = 0,187 + 3 \cdot 0,021 = 0,25$
2. Clasificación de capacidad según absorbancia:
  - No formadora de biopelícula:  $< 0,25$
  - Formadora débil de biopelícula:  $0,25 - 0,5$
  - Formadora moderada de biopelícula:  $0,5 - 1,0$
  - Formadora fuerte de biopelícula:  $> 1,0$

**FIGURA 6. Formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* en microplaca de poliestireno con TSB (DO 595 nm)**



**TABLA 6. Cepas de *Listeria monocytogenes* formadoras de biopelículas empleando como medio de enriquecimiento BHI.**

Cepa	Absorbancia Cepa 1	Absorbancia Cepa 2	Absorbancia Cepa 3	Promedio	Desviación Estándar
16	0,449	0,516	0,395	0,453	0,0609
17	0,518	0,436	0,440	0,465	0,0462
32	0,546	0,650	0,557	0,584	0,0571
33	1,188	1,278	0,980	1,149	0,1528
34	0,721	0,600	0,603	0,641	0,0690
52	1,127	0,996	0,823	0,982	0,1525
54	0,403	0,735	0,612	0,583	0,1681
55	0,548	0,394	0,255	0,399	0,1466
57	0,276	0,356	0,216	0,283	0,0702
59	0,260	0,232	0,256	0,249	0,0151
61	0,240	0,312	0,305	0,286	0,0397
65	0,375	0,469	0,456	0,433	0,0509
69	0,387	0,345	0,321	0,351	0,0334
73	0,356	0,323	0,298	0,326	0,0291
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	0,330	0,409	0,305	0,348	0,0543
Control	0,230	0,278	0,202	0,237	0,0385

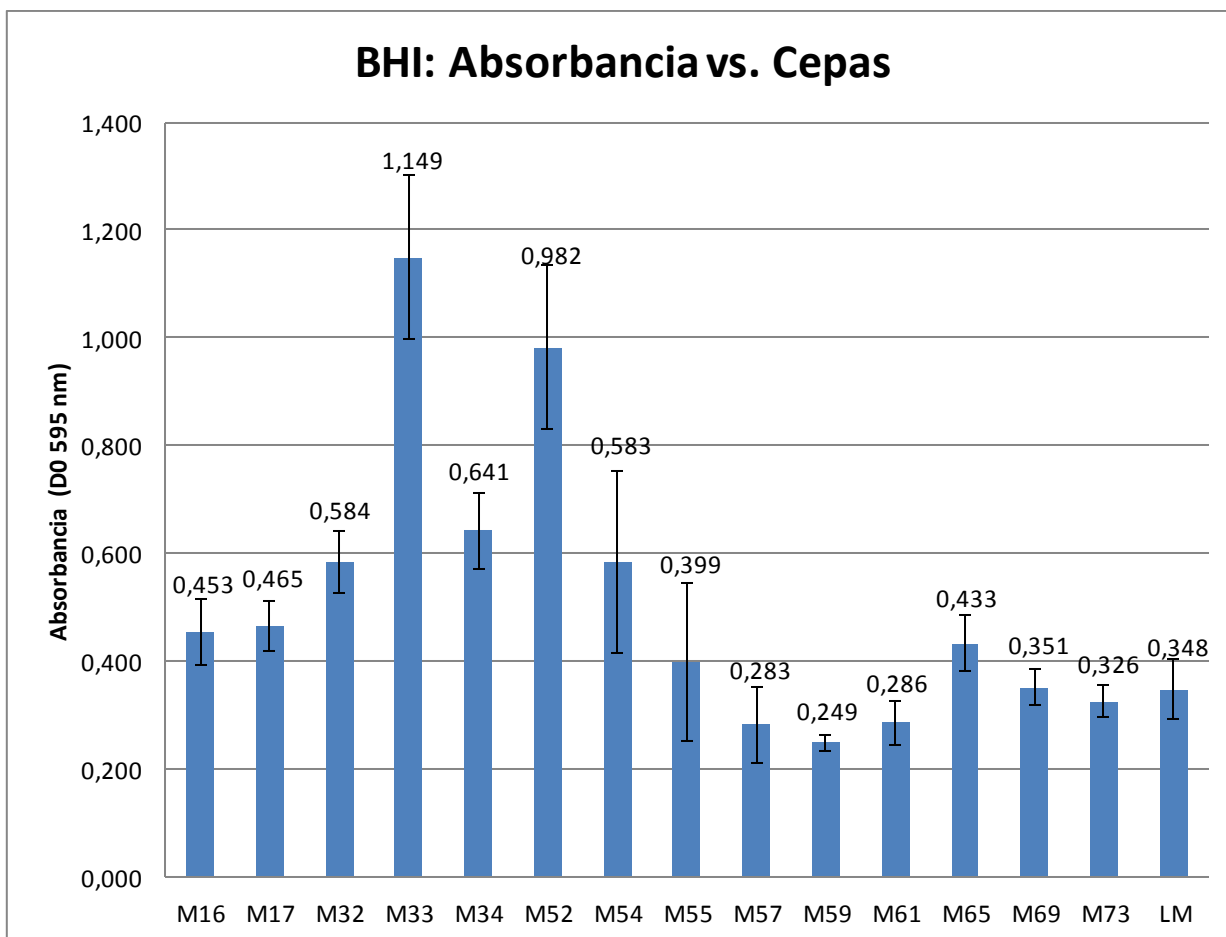
Leyenda:

	No formadora de biopelículas
	Formadora débil de biopelículas
	Formadora moderada de biopelículas

Clasificación de capacidad de formación de biopelícula según Stepanovic:

3. Cálculo del DOC=  $0,237 + 3 \cdot 0,0385 = 0,352$
4. Clasificación de capacidad según absorbancia:
  - No formadora de biopelícula:  $< 0,352$
  - Formadora débil de biopelícula:  $0,352 - 0,704$
  - Formadora moderada de biopelícula:  $0,704 - 1,408$
  - Formadora fuerte de biopelícula:  $> 1,408$

**FIGURA 7. Formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* en microplaca de poliestireno con BHI (DO 595 nm)**



**TABLA 7. Comparación de capacidad de formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* empleando TSB y BHI como sustrato.**

<i>Capacidad de formación de biopelícula</i>	<i>TSB</i>	<i>BHI</i>
No formadora de biopelícula	35,71% (6)	35,71% (6)
Formadora débil de biopelícula	57,15% (8)	50% (7)
Formadora moderada de biopelícula	7,14% (1)	14,29% (2)
Formadora fuerte de biopelícula	0	0



## V. DISCUSIÓN

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo que puede causar listeriosis principalmente en neonatos, mujeres embarazadas, ancianos y pacientes inmunosuprimidos. Así mismo, tiene capacidad de proliferación en entornos fríos y húmedos, ideales para la formación de biopelículas, es por ello que la presente tesis pretende contribuir al conocimiento de las biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* de quesos frescos.

La incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos del presente estudio fue de 18,67%. Dichos resultados coinciden con lo reportado por la Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos (UERIA) en Colombia. La UERIA consolidó los resultados de las acciones de inspección, vigilancia y control en Colombia durante el periodo 2000-2009, los cuales incluyeron 3700 muestras de quesos analizadas para detectar *Listeria monocytogenes*, de las cuales 18,78% resultaron positivas para este patógeno<sup>54</sup>. La incidencia de *Listeria monocytogenes* encontrada en el presente estudio se considera elevada y coincide con diversos autores a nivel latinoamericano; por ejemplo, en Chile, Davison<sup>55</sup> investigó la presencia de *Listeria monocytogenes* en 68 muestras de quesos frescos artesanales, obteniendo una incidencia de 15% (10/68) de *Listeria monocytogenes*, siendo también un valor acorde a lo encontrado en la presente investigación. En México, Soto<sup>56</sup> realizó un estudio de incidencia de *Listeria monocytogenes* en un total de 75 quesos frescos, obteniendo un valor de 9,3%. En Brasil, Brito<sup>57</sup> determinó la presencia de *Listeria*

*monocytogenes* en leche, queso fresco y en ambientes industriales, obteniendo la incidencia de 11% (6/55) en quesos frescos.

Por otro lado, la incidencia de *Listeria monocytogenes* del presente estudio es mayor a lo encontrado por diversos investigadores en el Perú. En el 2012, Díaz<sup>58</sup> detectó la presencia de *Listeria monocytogenes* en 3,34% de muestras de quesos frescos adquiridos en la ciudad de Trujillo. También en el 2012, Bautista<sup>59</sup> detectó la presencia de *Listeria monocytogenes* en 17,14% de quesos frescos procedentes de mercados de Lima Norte según el método microbiológico; pero según el método molecular Bautista confirmó la presencia de dicho patógeno en 8,6% de quesos frescos. La incidencia encontrada en el presente estudio es similar a los resultados encontrados por Bautista empleando el método microbiológico; sin embargo, las diferencias observadas se deben a diversos factores; por ejemplo, dicho investigador realizó el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para confirmar la especie *Listeria monocytogenes* en lugar del ensayo de CAMP, el cual fue desarrollado en el presente estudio y que es considerada como prueba confirmatoria para *Listeria monocytogenes* según el Manual de Bacteriología Analítica de la FDA<sup>14</sup>; así como también, el número de muestras de quesos frescos analizados en el presente estudio fue mucho mayor y la zona de estudio fue más delimitada (Cercado de Lima).

La producción de biopelículas de *Listeria monocytogenes* en el presente estudio fue muy variable, ya que el rango de absorbancias osciló entre 0,2 a 1,3 según la densidad óptica medida a 595 nm. Dichos resultados coinciden con las investigaciones de Djordjevic et al<sup>51</sup>, quienes estudiaron la capacidad de formación

de biopelículas de 31 cepas de *Listeria monocytogenes* encontrando absorbancias que oscilaron entre 0,3 a 1,4 medidas igualmente a 595 nm.

Se evaluó la capacidad de formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* empleando dos medios de cultivo de diferente composición nutricional, tales como el TSB (medio de cultivo poco enriquecido) y el BHI (medio de cultivo muy enriquecido). Se obtuvo que 64,29% de las cepas formaron biopelículas con ambos medios de cultivo; sin embargo, hubo diferencias respecto a los niveles de formación de biopelículas. Al emplear TSB, se obtuvo 7,14% de cepas formadoras moderadas de biopelículas y 57,15% de formadoras débiles y para el BHI se obtuvo 14,29% de cepas formadoras moderadas y 50% de formadores débiles. Carrillo<sup>60</sup> en su estudio encontró 6% de formadores débiles de biopelículas de *Listeria monocytogenes* al emplear TSB diluido en la proporción 1:20; así mismo obtuvo 6% de formadores moderados y 94% de formadores débiles al emplear BHI, según las condiciones de incubación de 35°C y 24 horas. Las diferencias observadas en la capacidad de formación de biopelícula del presente estudio respecto a los resultados planteados por Carrillo podrían deberse al empleo de diferentes métodos de cuantificación y condiciones de incubación.

Harvey<sup>49</sup> en su investigación sobre producción de biopelículas, analizó 138 cepas de *Listeria monocytogenes* empleando como medio de cultivo TSB y encontró que todas las cepas eran formadoras de biopelículas clasificándolas como débiles (92%), moderadas (6.5%) y fuertes (1.5%). Dichos resultados difieren del presente estudio debido a que Harvey clasificó la capacidad de formación de biopelículas de las cepas arbitrariamente y no menciona el uso de un

algoritmo para dicha clasificación, el cual se realizó en el presente estudio tomando las recomendaciones sugeridas por Stepanovic<sup>53</sup>.

Los resultados obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto la influencia del nivel nutricional del medio de cultivo sobre la formación de biopelículas, ya que se observó diferencias estadísticamente significativas entre las absorbancias de los medios TSB y BHI ( $p < 0.05$ ). El medio BHI permitió la expresión de una mayor cantidad de formadores moderados de biopelículas que el medio TSB. Dichos resultados coinciden con las investigaciones de Carrillo y Stepanovic<sup>53, 60</sup>. Sin embargo, difieren con lo reportado por Kadam<sup>61</sup>, ya que dicho investigador encontró una mayor producción de biopelículas en medios mínimamente enriquecidos, postulando que condiciones mínimas nutricionales pueden estimular la producción de biopelículas por *Listeria monocytogenes*. Kim y Frank<sup>62</sup> sostienen que la triptona promueve la producción de biopelículas de *Listeria monocytogenes* en las etapas iniciales de adhesión, lo cual es coherente con los resultados del presente trabajo debido a que el medio BHI posee un porcentaje más elevado de triptona que el medio TSB.

Según lo comentado en párrafos anteriores, la prevalencia de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos es considerable y al mismo tiempo preocupante ya que dicho alimento tiene una gran demanda por la población limeña. La presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos podría deberse al uso de leche contaminada para su elaboración, así como también a la ausencia de programas de limpieza y desinfección eficientes durante la producción; y en el almacenamiento debido a contaminación cruzada. Por tal

motivo, se deben implementar programas tales como el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) o las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en la producción y almacenamiento de quesos frescos artesanales. De la misma forma, la considerable cantidad de cepas de *Listeria monocytogenes* con capacidad de formar biopelícula encontrada en el presente estudio es preocupante debido a que la presencia de biopelículas está asociada a un incremento en la resistencia a antibióticos y desinfectantes, así como también la posibilidad de ocasionar la contaminación de los ambientes y equipos empleados en la producción de quesos frescos.

## VI. CONCLUSIONES

- Se aisló e identificó *Listeria monocytogenes* de 14 muestras de quesos frescos adquiridos en 10 mercados del Cercado de Lima.
- La incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos adquiridos en 10 mercados del Cercado de Lima fue 18,67% (14/75). En los mercados Primero de mayo y La Aurora 37,5% (3/8) de las muestras de quesos frescos presentaron *Listeria monocytogenes*; en el mercado Melchoritas, 33,3%(1/3); en los mercados Santa Rosa y Buenos Aires, 25% (2/8); en los mercados Palomino, Central y La Merced, 12,5% (1/8); y en los mercados Idelfonso y El progreso no se detectaron muestras positivas.
- Se obtuvo que 64,29% de las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos tienen capacidad de formar biopelículas.
- Se encontró que 7,14% (1/14) de las cepas de *Listeria monocytogenes* tienen capacidad moderada, 57,15% (8/14) tienen capacidad débil y 35,71% (5/14) no tienen capacidad de formar biopelículas cuando se empleó TSB como sustrato. Cuando se empleó BHI, se encontró que 14,29% (2/14) de las cepas tienen capacidad moderada de formar biopelículas, 50% (7/14) tienen capacidad débil y 35,71% (5/14) no tienen capacidad de formar biopelículas.

## VII. RECOMENDACIONES

La capacidad de formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* depende de una serie de factores, ya sea relacionados a las propiedades fisicoquímicas de la superficie como hidrofobicidad, pH, temperatura y composición de nutrientes; o relacionados a las cepas como el serotipo o el origen. Sin embargo, aún se conoce muy poco sobre la influencia de dichos factores en la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* por lo que debe fomentarse su investigación.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palou A, Badiola JJ, Anadón A, Bosch A, Cacho JF, Cameán AM et al. Informe del comité científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. Rev. Com. Cient. AESAN, 12, pp 37-59. [citado el 14/04/2015] Disponible en: [http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/publicaciones\\_estudios/revistas/comite\\_cientifico\\_12.pdf](http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/revistas/comite_cientifico_12.pdf)
2. Téllez S. Los Biofilm y su repercusión en la Industria Alimentaria. VISAVET Outreach Journal. 2010. [citado el 29/12/2014] Disponible en: <https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>
3. Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. Revista MVZ. 2005; 10(1):511-543.
4. Otero FJ, Monroy VA, Carranco JA, Mackinney F, Estudillo GE, González N. Meningitis bacteriana por *Listeria monocytogenes*: presentación de un caso y revisión de la literatura. Rev Enf. Infec Ped. 2011; 24(95):118-120.
5. Comisión del Codex Alimentarius. Proyecto de directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos. Estados Unidos. 2006:79-99



6. Navia DP, Villalda HS, Mosquera SA. Las Biopelículas en la Industria de Alimentos. Rev. Bio. Agro. 2010; 8(2):118-128.
7. Adams MR, Moss MO. Food Microbiology. Editorial New Age International (P) Limited Publishers. Primera edición. La India. 2006, pp. 186-191.
8. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev. 1991; 55(3): 476-511.
9. Gray ML, Killinger AH. *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections. Bacteriol Rev. 1966; 30(2): 309-371.
10. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Three The Firmicutes. Editorial Springer. Segunda edición. Nueva York. 2009, pp. 244-257.
11. Ryser ET, Marth EH. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Editorial Marcel Dekker. Segunda edición. Florida. 1999, pp. 1-5.
12. Ramírez L. Evaluación de los métodos tradicionales y la tecnología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la detección de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso blanco fresco y queso blanco pasteurizado. [Trabajo de grado]. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Venezuela. 2005. [citado el 15/03/2015]. Disponible en: [http://www.nucleovalencia.com.ve/revista/publicaciones/tesis\\_luis\\_ramirez.pdf](http://www.nucleovalencia.com.ve/revista/publicaciones/tesis_luis_ramirez.pdf)
13. Jones CE. Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*. [Tesis doctoral]. Editorial Proquest. Estados Unidos. 1997.

14. Hitchins A, Jinneman K. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. US Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 9th Edition. Maryland. 2011.
15. López V, Suárez M, Chico-Calero I, Navas J, Martínez-Suárez JV. *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? Rev. Argent. Microbiol. 2006; 38: 224-234.
16. Vera A, González G, Domínguez M, Bello H. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. Rev Chilena Infectol. 2013; 30(4): 407-416.
17. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). *Listeria* (Listeriosis), Definición y síntomas. [citado el 03/01/2015]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/listeria/definition.html>
18. Pascual MR. Enfermedades de origen alimentario, su prevención. Editorial Díaz de Santos. Madrid. 2005, pp. 65-71.
19. Pini PN, Gilbert RJ. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. Int J Food Microbiol. 1988; 6(4): 317-326.
20. Chavada R, Keighley C, Quadri S, Asghari R, Hofmeyr A, Foo H. Uncommon manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. BMC Infectious Diseases. 2014; 14(641):1-6.
21. Hernández-Milian A, Payeras-Cifre A. What is new in Listeriosis? BioMed Research International. Mallorca. 2014: 358051.
22. Parrilla F. Estudio de incidencia de listeriosis en España. [Tesis doctoral] Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Medicina. España. 2011. [citado el 24/02/2015]. Disponible en:

<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/84002/fpv1de1.pdf;jsessionid=557E0A0ACD3A154F6975F570AF8661EA.tdx1?sequence=1>

23. Cecchini E, Gonzalez S. Infectología y enfermedades infecciosas. Ediciones Journal. Primera edición. Buenos Aires; 2008. pp. 546-553.
24. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. Editorial El Servier. Octava Edición. Nueva York. 2014. pp. 2383-2391.
25. Villegas M. Caracterización molecular de cepas clínicas de *Listeria monocytogenes* aisladas en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima durante el periodo 2001-2005. [Tesis para optar al grado de Magíster]. Lima – Perú. 2010.
26. D'Orazio SE. Animal models for oral transmission of *Listeria monocytogenes*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2014; 4 (15): 1-6.
27. Liu D. Handbook of *Listeria monocytogenes*. Editorial CRC Press Taylor & Francis Group. Estados Unidos. 2008.
28. Dussurget O, Bierne H, Cossart P. The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* and the interferon family: type I, type II and type III interferons. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 4(50):1-4
29. Carvalho F, Sousa S, Cabanes D. How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 4(48): 1-4.
30. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern Food Microbiology. Editorial Springer & Business Media. Séptima Edición. Nueva York. 2005. pp. 606-610.

31. Gellin BG, Broome CV, Bibb WF, Weaver RE, Gaventa S, Mascola L. The epidemiology of listeriosis in the United States. *Am J Epidemiol.* 1986; 133(4): 392-401.
32. Goldfine H, Shen H. *Listeria monocytogenes*, Pathogenesis and Host Response. Editorial Springer Science & Business Media. Nueva York. 2007.
33. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infectious Disease.* 2013; 13(11): 1-7.
34. Feng Y, Wu S, Varma JK, Klena JD, Angulo FJ, Ran L. Systematic review of human listeriosis in China, 1964 – 2010. *Tropical Medicine and International Health.* 2013; 18(10): 1248-1256.
35. Tappero JW, Schuchat A, Deaver KA, Mascola L, Wenger JD. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The Listeriosis Study Group. *JAMA.* 1995; 273(14): 1118-1122
36. Sedano R, Fica A, Guíñez D, Braun S, Porte L, Dabanch J et al. Infecciones por *Listeria monocytogenes*, una experiencia de dos décadas. *Rev chilena Infectol.* 2013; 30(4): 417-425.
37. Pereda J, Orbegoso C, Larch M. Listeriosis en el recién nacido. Reporte de un caso. *Rev Med Per.* 1963. 32(334): 135-140.
38. Guevara JM. A case of hematometra infected by *Listeria monocytogenes*. *Zentralbl Bakteriolog Orig.* 1979; 243(4): 547-548
39. Díaz C. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la

- superficie. [Tesis doctoral] Universidad Nacional de La Plata. 2011. [citado el 09/03/2015] Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2685>
40. Donlan, RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002; 8(9): 881-890.
41. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2): 167-193
42. Wong GC, O'Toole GA. All together now: Integrating biofilm research across disciplines. *MRS Bull*. 2011; 36(5): 339-342.
43. Cadena E. Estudio de la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* EDGe sobre superficies de vidrio y acero inoxidable y su control. [Tesis para optar al grado de Ingeniero de los alimentos] México. 2011 [citado el 12/08/2015] Disponible en: <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/1649/1/RI001175.pdf>
44. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6(3): 199-210.
45. Lewandowski Z, Beyenal H. Fundamentals of biofilm research. Segunda edición. Editorial CRC Press. 2014. Estados Unidos.
46. Philips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. Biofilms made easy. *Wounds Internacional*. 2010; 1(3). [citado el 15/04/2015] Disponible en: [http://www.woundsinternational.com/media/issues/656/files/content\\_10739.pdf](http://www.woundsinternational.com/media/issues/656/files/content_10739.pdf)
47. Serrano J, Herrera D, León R. Placa bacteriana: Su papel en las enfermedades de la encía. Factores que modifican la acción de la placa

- bacteriana. En: Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración Manual de Higiene Bucal. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 2009.
48. Mendes MD. The characterization of biofilm attachment to metal interfaces: effects of substratum properties. [Tesis de grado Magíster] Estados Unidos. 2012. [citado el 29/04/2015] Disponible en: <http://digitalcommons.calpoly.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1861&context=theses>
49. Harvey J, Keenan KP, Gilmour A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. Food Microbiol. 2007; 24: 380-392.
50. Purkrťová S, Turonová H, Pilchová T, Demnerová K, Pazlarová J. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Disinfectants. Czech J. Food Sci. 2010; 28(4): 326-332.
51. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(6): 2950-2958.
52. Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(12): 7336-7342.
53. Stepanović S, Ćirković I, Ranin L, Švabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Lett Appl Microbiol. 2004; 38(5): 428-432.
54. Instituto Nacional de Salud. Subdirección de Investigación. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. 2011. [citado el 05/05/2015]. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de->

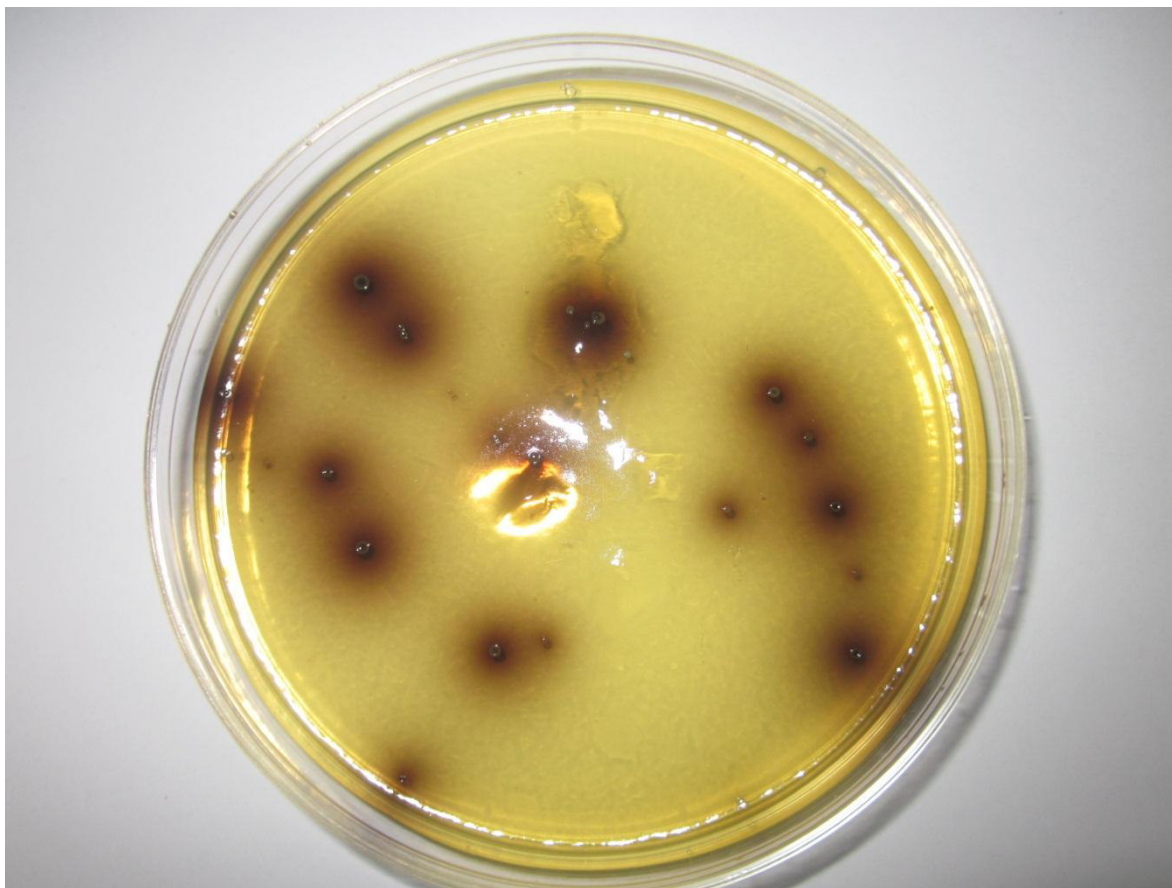
55. Davison P. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales. [Tesis de Licenciatura] Universidad de Talca, Chile. 2009. [citado el 07/05/2015] Disponible en: [http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/8095/2/davison\\_faundez.pdf](http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/8095/2/davison_faundez.pdf)
56. Soto M, Gerba CP, Porto Fett A, Luchansky JB, Chaidez C. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from small Mexican retail markets of queso fresco. International Journal of Environmental Health Research. 2015; 25(2):140-148.
57. Brito JR, Santos EM, Arcuri EF, Lange CC, Brito MA, Souza GN et al. Retail survey of Brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(15): 4954-4961.
58. Díaz MA, Chávez M, Saucedo EA. *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la provincia de Trujillo, Perú. Revista Ciencia y Tecnología, Escuela de Postgrado - UNT. Perú. 2012.
59. Bautista A. Detección de *Listeria monocytogenes* por métodos microbiológicos y moleculares en productos cárnicos y derivados lácteos procedentes de diferentes mercados de Lima norte. [Tesis para optar título profesional de Químico-Farmacéutico] Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. 2012.

60. Carrillo G, Redondo M, Arias ML. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de queso tierno de origen costarricense. Archivos latinoamericanos de nutrición. 2010; 60 (2): 175-178.
61. Kadam SR, den Besten HM, van der Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. Int J Food Microbiol. 2013; 165: 259-264.
62. Kim KY, Frank JF. Effects of Nutrients on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* on Stainless Steel. Journal of Food Protection. 1995; 58(1): 24-28.

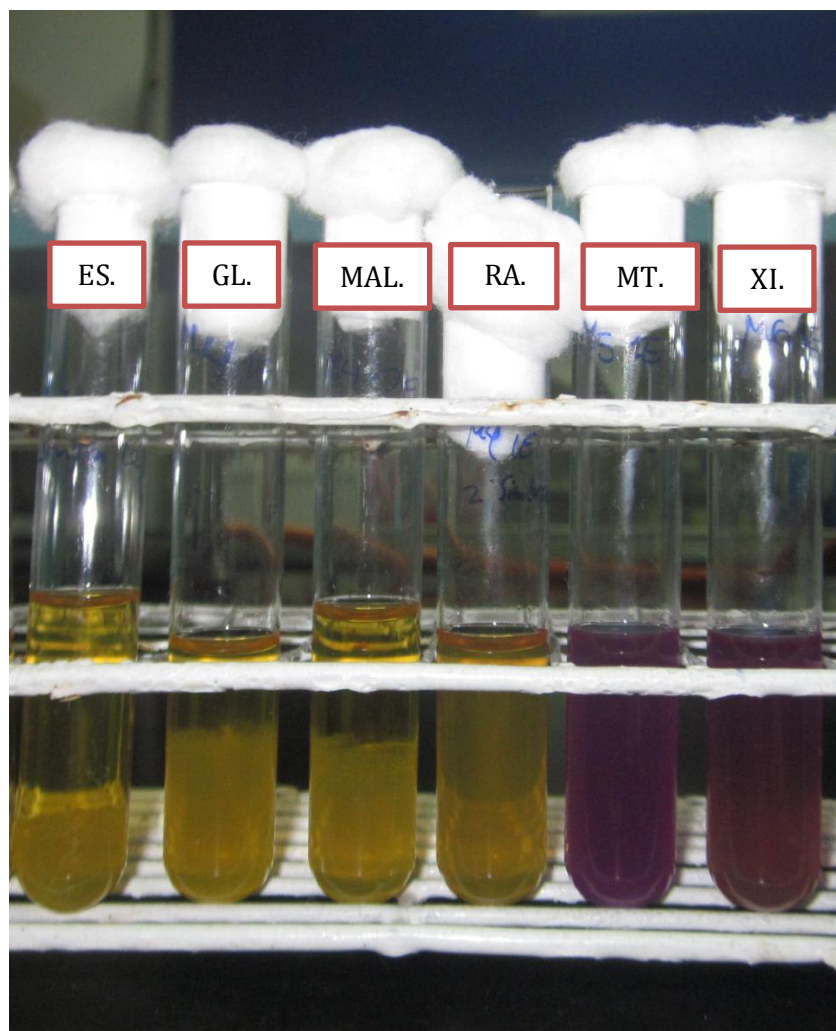


## IX. ANEXOS

**FIGURA 8. COLONIAS DE *Listeria monocytogenes* EN AGAR OXFORD**



**FIGURA 9. Fermentación de *Listeria monocytogenes* en Caldo Púrpura de Bromocresol con carbohidratos al 5%.**



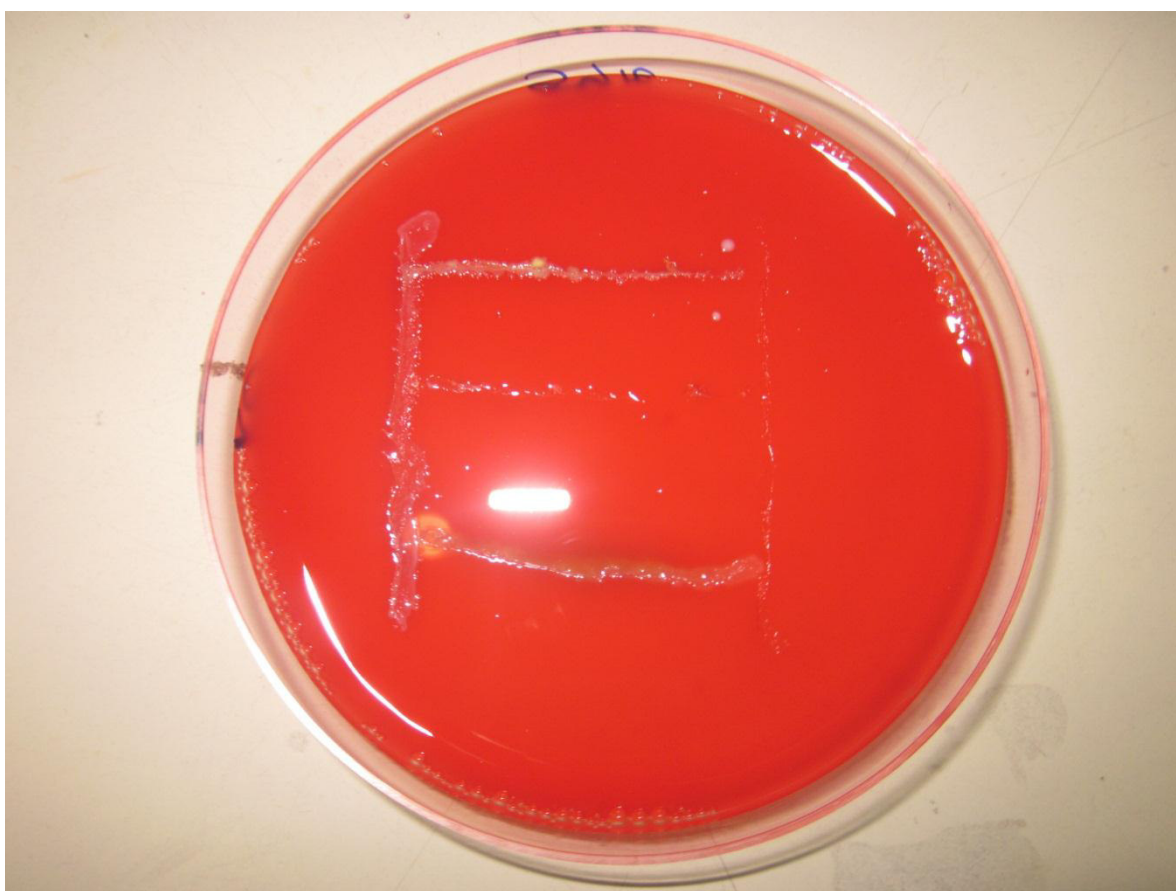
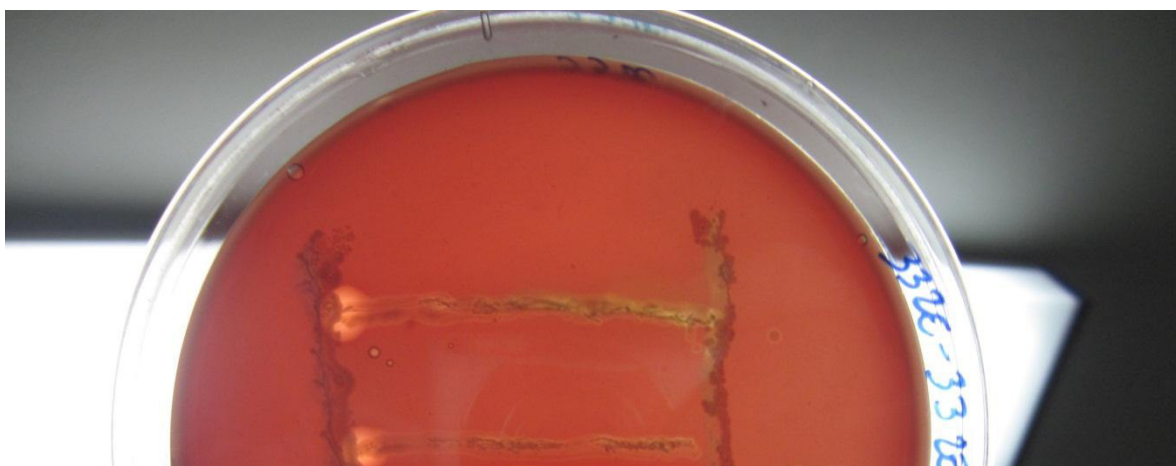
Leyenda: ES.: Esculina, GL.: Glucosa, MAL.: Maltosa, RA.: Ramnosa, MT.:  
Manitol, XI.: Xilosa

**FIGURA 10. Prueba de Reducción de nitratos de *Listeria sp.***



La presencia de coloración naranja confirma la especie *Listeria grayi* subespecie  
*murrayi*

**FIGURA 11. Prueba de CAMP (Christie – Atkins – Munch – Peterson)**





**FIGURA 12. Biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* en microplaca de 96 pocillos de poliestireno**

